

Aus dem Deutschen Diabetes Zentrum
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
An der Heinrich-Hein-Universität Düsseldorf
Institut für klinische Diabetologie
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Michael Roden

Assoziation von Leber-ATP-Gehalt in vivo mit Insulinresistenz und Rolle von Einflussfaktoren in einer nicht-diabetischen Population

Dissertation zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franziska Wallscheid
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich Heine Universität

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. univ. Michael Roden

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Regina Ensenaer

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kahl S, Nowotny B, Strassburger K, Bierwagen A, Klüppelholz B, Hoffmann B, Giani G, Nowotny PJ, Wallscheid F, Hatziagelaki E, Pacini G, Hwang JH, Roden M. (2018), Amino Acid and Fatty Acid Levels affect Hepatic Phosphorus Metabolite Content in Metabolically Healthy Humans, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103 (2): 460-468.

I Zusammenfassung

Der Typ-2 Diabetes ist oft assoziiert mit einer Insulinresistenz, welche der Erkrankung häufig Jahre vorausgeht. Die genaue Pathogenese der Insulinresistenz ist bis heute nicht endgültig geklärt. Verschiedene Arbeiten ergaben Zusammenhänge zwischen Insulinresistenz, nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) und Störungen der Mitochondrienfunktion, wobei diese zumeist Patienten mit bereits manifestiertem Typ-2 Diabetes oder bestehender NAFLD untersuchten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob die Insulinsensitivität auch in einer nicht-diabetischen Population mit dem hepatischen Energiestoffwechsel in Verbindung steht und durch welche ein möglicher Zusammenhang beeinflusst wird.

Die Studienkohorte umfasste 76 nicht-diabetische Probanden, bei welchen ein standardisiertes Interview, anthropometrische Messungen, eine Blutuntersuchung, ein oGTT und eine MRT/MRS-Untersuchung zur Ermittlung der hepatischen Phosphormetabolite sowie von hepatozellulärem, subkutanem und viszeralem Fettgehalt vorgenommen wurden.

Die Untersuchungen ergaben, dass bei nicht-diabetischen Personen der hepatischen Energiestoffwechsels, gemessen als γ -ATP, Pi und Pi/ γ -ATP, nicht mit der Insulinsensitivität assoziiert ist. Probanden mit hepatischer Steatose zeigten höhere hepatische γ -ATP-Konzentrationen, dieser Zusammenhang war jedoch nach Adjustierung auf Alter und Geschlecht nicht mehr nachweisbar.

Die Beobachtung, dass in einer nicht diabetischen-Population kein Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und des hepatischen γ -ATP-Gehalts besteht, weist darauf hin, dass erst schwerwiegende Stoffwechselstörungen wie Typ-2 Diabetes oder NAFLD zu einer Adaptation der hepatischen, mitochondrialen Funktion führen.

I Summary

Type 2 diabetes is commonly associated with insulin resistance and often insulin resistance precedes the diagnosis of type 2 diabetes for years. The pathogenesis of insulin resistance is still not fully understood. Different studies found associations between insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and abnormal mitochondrial function, but most of the patients included in those studies were diagnosed with type 2 diabetes or NAFLD.

The aim of this study was to investigate if insulin sensitivity is associated with hepatic energy metabolism in a non-diabetic population and factors possibly influencing such association. The study cohort included 76 non-diabetic participants who underwent a standardized interview, anthropometric measurements, blood sampling and oral glucose tolerance testing. Magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging were used to determine the absolute concentrations of hepatic phosphorus metabolites as well as hepatocellular, subcutaneous and visceral fat content.

The results showed no association between insulin sensitivity and the hepatic energy metabolism, measured as γ -ATP, Pi and Pi/ γ -ATP, in this non-diabetic population. Participants with hepatic steatosis tended to have higher hepatic γ -ATP concentrations, which disappeared after adjustment for age and gender. The absence of any association between insulin sensitivity and the major hepatic phosphorus metabolites indicates that only metabolic disorders such as type 2 diabetes or NAFLD but not insulin resistance per se may lead to an adaption of hepatic mitochondrial function.

II Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Typ-2 Diabetes mellitus	1
1.2.1 Epidemiologie.....	1
1.2.2 Diagnostik	3
1.2.3 Pathogenese des Typ-2 Diabetes mellitus	5
1.2.3.1 Genetische Prädisposition	6
1.2.3.2 Umwelteinflüsse/Lebensstil	6
1.3 Insulinresistenz.....	7
1.3.1 Periphere/muskuläre Insulinresistenz.....	7
1.3.2 Hepatische Insulinresistenz.....	10
1.3.2.1 Auswirkungen der hepatischen Insulinresistenz auf den Stoffwechsel	11
1.3.3 Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)	13
1.3.4 Rolle der Mitochondrien bei der hepatischen Insulinresistenz.....	15
1.4 Bereits veröffentlichte Arbeiten zum Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, ATP-Gehalt der Leber und Fettgehalt der Leber	17
1.4.1 Untersuchungen im Tiermodell.....	17
1.4.2 Untersuchungen beim Menschen.....	18
1.5 Hypothese und Zielsetzung	21

2 Studienkollektiv, Methoden und Material 22

2.1 Studienkollektiv.....	22
2.1.1 Nationale Kohorte (Machbarkeitsstudie)	22
2.1.2 Studiendesign.....	22
2.1.3 Probandenkollektiv- und rekrutierung.....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Ablauf der Studientage.....	23
2.2.2 Anthropometrie.....	24
2.2.3 Blutdruckmessung.....	24
2.2.4 Ausführliche Anamnese und Fragebogen zum Lebensstil	24
2.2.5 Blutentnahme, Probenverarbeitung und-lagerung.....	25
2.2.6 Laborbestimmungen.....	28
2.2.7 MRT/MRS-Untersuchung	32
2.2.7.1 Bestimmung des Ganzkörperfettgehalts mit ¹ H-MRT	33
2.2.7.2 Bestimmung des Leberfettgehaltes mit ¹ H-MRS	33
2.2.7.3 Bestimmung des Leber-ATP-Gehaltes mit ³¹ P-MRS	34
2.2.8 Indizes zur Bestimmung der Insulinsensitivität, der hepatischen Extraktion und der hepatischen Steatose	35

2.2.8.1	OGIS (Oral Glucose Insulin Sensitivity)	35
2.2.8.2	QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index)	35
2.2.8.3	ISComp (Matsuda-Index)	35
2.2.8.4	Hepatische Insulinextraktion.....	36
2.2.8.5	Hepatic Steatosis Index (HSI).....	36
2.2.9	Statistische Auswertung	36
2.3	Material.....	37
3	Ergebnisse 42	
3.1	Studienkohorte	42
3.2	Probandencharakteristika	43
3.3	Konzentrationen der Phosphormetabolite in der Leber.....	44
3.4	Assoziationen mit dem Leber ATP-Gehalt.....	46
3.5	Unabhängige Prädiktoren des Leber-ATP-Gehaltes	46
3.6	Basischarakteristika abhängig von der hepatischen Steatose.....	48
3.7	Basischarakteristika abhängig von der Insulinsensitivität	52
3.8	Unabhängige Prädiktoren des Leber-ATP-Gehaltes bezogen auf die Insulinsensitivität	54
4	Diskussion 57	
4.1	BMI und Leber-ATP-Gehalt	57
4.2	Insulinresistenz und Leber-ATP-Gehalt.....	59
4.3	NASH und Leber-ATP-Gehalt.....	60
4.4	Limitationen der Studie	60
4.5	Ausblick	61
5	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 62	
5.1	Abbildungsverzeichnis	62
5.2	Tabellenverzeichnis	62
6	Literaturverzeichnis 63	
7	Abkürzungsverzeichnis 73	
8	Danksagung 75	

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist, welche auf einer gestörten Insulinsekretion, einer Insulinresistenz der Körperzellen oder einer Kombination aus beidem beruht.

Man unterscheidet vier verschiedene Formen des Diabetes nach Ätiologie und Pathogenese. Der Typ-1 Diabetes ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, der Typ-2 Diabetes durch einen relativen Insulinmangel auf dem Boden einer Insulinresistenz. Der Typ-3 Diabetes kann verschiedener Ätiologie sein (Genmutation, Endokrinopathien, immunologisch, infektiös, toxisch durch Drogen, Chemikalien oder Medikamente), und der Gestationsdiabetes wird erstmals in einer Schwangerschaft diagnostiziert und ist mit einem erhöhten Risiko für das nachfolgende Auftreten eines Typ 2 Diabetes assoziiert ¹.

Der Typ-2 Diabetes ist mit einem Anteil von 90 bis 95% die am häufigsten vorkommende Form und in Deutschland sowie anderen Industrieländern zusammen mit dem Typ-1 Diabetes die klinisch relevante Form. Charakteristisch für den Typ-2 Diabetes ist die Insulinresistenz, welche sich über Jahre in den verschiedenen Geweben des Körpers entwickelt. Diese kann zunächst durch eine kompensatorische Steigerung der Insulinausschüttung aus den β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas kompensiert werden. Im Verlauf kommt es zu deren zunehmender Erschöpfung, was zu einem relativen Insulinmangel führt. Da die zugeführte Glukose nicht mehr entsprechend verwertet wird, resultiert eine chronische Hyperglykämie. Symptome der chronischen Hyperglykämie sind Glukosurie, Polyurie, Polydipsie und ein nicht anders erklärbarer Gewichtsverlust ².

1.2 Typ-2 Diabetes mellitus

1.2.1 Epidemiologie

In Deutschland ist die Prävalenz des Typ-2 Diabetes bezogen auf die Gesamtbevölkerung von 1998 bis 2011 um 38% gestiegen. Dies ergab der Vergleich

1 Einleitung

des Bundes-Gesundheitssurvey 1998“ und die „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“. Insgesamt wurde in der 2013 veröffentlichten Studie bei 7,2% der Erwachsenen zwischen 18 und 79 Jahren ein Diabetes diagnostiziert³. Weltweit lag die Prävalenz des Diabetes im Jahr 2000 bei 2,8% und man ging davon aus, dass diese bis zum Jahr 2030 auf 4,4% ansteigen würde, was 366 Millionen Menschen, die an Diabetes erkrankt sind, entspricht. Da die Weltgesundheitsorganisation im August 2011 angab, dass weltweit schätzungsweise 347 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt sind, ist davon auszugehen, dass es zu weitaus mehr Betroffenen bis zum Jahr 2030 kommen wird⁴.

Der starke Anstieg des Diabetes ist besonders assoziiert mit dem steigenden Lebensalter der Gesamtbevölkerung. Die Hälfte der an Diabetes erkrankten Personen in den USA ist älter als 60 Jahre, wobei die höchste Prävalenz der Erkrankung bei den über 80-jährigen zu beobachten ist. Durch medizinischen Fortschritt kommt es zu einer Erhöhung des Durchschnittsalters der Weltbevölkerung und insbesondere zu einem starken Anstieg von Personen älter als 65 Jahre in der Gesellschaft. Die Folgen der älter werdenden Bevölkerung sind das gehäufte Auftreten von zumeist chronischen Erkrankungen, zu welchen der Diabetes zählt⁵. Der starke Anstieg der Prävalenz des Diabetes ist allerdings nicht alleine auf den zunehmenden Anteil älterer Personen zurückzuführen. Zu den weiteren Risikofaktoren zählen unter anderem Übergewicht, Nikotinabusus, Bewegungsmangel und auch eine genetische Disposition, wobei Übergewicht bzw. Adipositas mit dem größten Risiko für die Entwicklung eines Typ-2 Diabetes einhergehen.

Mit der zunehmenden Zahl der Patienten mit Typ-2 Diabetes steigt auch die Häufigkeit von Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen. Zu diesen zählen die Retinopathie mit der Gefahr der Erblindung, die Nephropathie mit der Gefahr der terminalen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit, die Neuropathie mit dem Risiko des diabetischen Fußsyndroms mit Amputation und besonders die kardiovaskulären Erkrankungen mit Herzinfarkt, Schlaganfall und peripherer Durchblutungsstörung⁶.

Im Jahre 2007 lag der Anteil der Gesundheitsausgaben für Diabetes mellitus bei 19,1 Milliarden Euro in Deutschland. Eine stetig steigende Prävalenz des

1 Einleitung

behandlungsbedürftigen Typ-2 Diabetes führt in der Folge zu einem stetigen Anstieg der Kosten für diese Erkrankung ⁷.

Eine Optimierung der Präventionsmaßnahmen und der Effizienz der Behandlung des Diabetes sind daher aus sozialer, medizinischer und gesundheitsökonomischer Sicht unabdingbar. Das genaue Verständnis der Pathomechanismen ist für die Entwicklung neuer Präventionsmaßnahmen essentiell.

1.2.2 Diagnostik

Um die Diagnose eines Diabetes mellitus zu stellen, muss auf Basis der Empfehlungen der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) eines der folgenden vier Kriterien erfüllt sein ⁸:

1. $\text{HbA}_{1c} \geq 6,5\%$
2. Nüchternblutglukose im Plasma ≥ 126 mg/dl an 2 unterschiedlichen Tagen
3. einmalig gemessene Blutglukosekonzentration von ≥ 200 mg/dl mit klassischen Symptomen einer chronischen Hyperglykämie
4. Blutglukosekonzentration von ≥ 200 mg/dl 2 h nach oralem Glukosetoleranztest (oGTT)

Im klinischen Alltag finden vor allem die Kriterien eins bis drei eine häufige Anwendung, da der Kosten- und Zeitaufwand im Vergleich zum oGTT deutlich geringer ist ⁸. Der HbA_{1c} gibt Aufschluss über den mittleren Blutglukosewert der letzten 12 Wochen unabhängig davon, ob eine Fastenzeit vor der Blutentnahme eingehalten wurde oder nicht. Es handelt sich beim HbA_{1c} um den glykosylierten Anteil des Gesamthämoglobins und dieser steht in direktem Zusammenhang zur Höhe der durchschnittlichen Blutglukosekonzentration. So konnte festgestellt werden, dass der HbA_{1c} -Wert bei nicht therapierten Probanden mit Diabetes zwei- bis dreimal höher ist als bei gesunden Probanden ⁹. Zu berücksichtigen sind Umstände, die den HbA_{1c} verfälschen. Damit die Glykosylierung der Erythrozyten stattfinden kann, muss ein Glukoseeinstrom über den passiven GLUT-1-Transporter gewährleistet sein ¹⁰. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch bei gleicher Blutglukosekonzentration der Anteil des glykosylier-

1 Einleitung

ten Hämoglobins interindividuell unterschiedlich ist, sodass ein Vergleich des erhobenen HbA_{1c} lediglich im Verlauf bei einer Person sinnvoll ist und nicht der Vergleich der HbA_{1c} Werte zweier verschiedener Personen¹¹. Weiterhin wird die Bestimmung des HbA_{1c} durch Hämoglobinopathien sowie Anämien beeinflusst, bzw. Bedingungen, die eine Anämie begünstigen (Splenomegalie, Nephropathie, Sichelzellkrankheit, Thalassämie)¹².

Die einmalige Messung eines Blutglukosewertes von ≥ 200 mg/dl kombiniert mit klassischen Symptomen der Hyperglykämie oder die wiederholte Messung eines Nüchtern-Blutglukosewertes von ≥ 126 mg/dl sollten aufgrund der höheren Sensitivität des oGTT durch diesen ergänzt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch ein nicht pathologischer HbA_{1c} vorliegen kann und das Ergebnis des oGTT bereits eine gestörte Glukosetoleranz oder eine bereits erhöhte Nüchtern-Blutglukose anzeigt¹. Während der Durchführung eines oGTT wird der venöse Nüchtern-Blutglukosewert und der venöse Blutglukosewert zwei Stunden nach einer definierten oralen Glukoseaufnahme von 75 g Glukose gelöst in 300 ml Flüssigkeit gemessen. Ein Nüchtern-Blutglukosewert kann nach einer Fastenzeit von mindestens 8 Stunden valide bestimmt werden. Die Ergebnisse des oGTT sind mit den folgenden Referenzbereichen (**Tab. 1-1**) aus den Empfehlungen der ADA abzugleichen, um eine sichere Diagnose stellen zu können¹.

	Nüchternplasmaglukose	2h-Plasmaglukose
Physiologischer Befund	<110 mg/dl	<140 mg/dl
Gestörte Nüchternglukose (Impaired fasting glucose [IFG])	≥ 110 mg/dl - <126 mg/dl	<140 mg/dl
Gestörte Glukosetoleranz (Impaired glucose tolerance [IGT])	<110 mg/dl	≥ 140 mg/dl – 199 mg/dl
IFG + IGT	≥ 110 mg/dl - <126 mg/dl	≥ 140 mg/dl – 199 mg/dl
Diabetes mellitus	≥ 126 mg/dl	≥ 200 mg/dl

Tab. 1-1 Referenzwerte des oGTT bei venöser Glukosemessung¹

Ein weiterer Vorteil des oGTT gegenüber den übrigen Diagnosekriterien eines Diabetes mellitus ist die Möglichkeit, eine gestörte Nüchtern-Blutglukose (IFG),

1 Einleitung

eine gestörte Glukosetoleranz (IGT) oder eine Kombination dieser beiden (IFG+IGT) als verschiedene Ausprägungen des Prädiabetes zu diagnostizieren. Aufgrund der oben genannten Vorteile des oGTT gegenüber den weiteren Diagnosekriterien des Diabetes mellitus gilt dieser als Goldstandard in der Diagnostik des Diabetes mellitus ⁸.

1.2.3 Pathogenese des Typ-2 Diabetes mellitus

Postprandial führt ein erhöhter Blutglukosespiegel physiologisch zur Insulinausschüttung durch die β -Zellen des Pankreas. Das freigesetzte Insulin wirkt über den Insulinrezeptor, der unter anderem von der Leber, der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe exprimiert wird. In der Leber führt die Insulinwirkung zur Steigerung der Glykogensynthese und zur Hemmung der Glukoneogenese, in der Skelettmuskulatur zur Glukoseaufnahme aus dem Blut in die Skelettmuskelzellen und im Fettgewebe hemmt das Insulin die Lipolyse und fördert die Synthese und Speicherung von freien Fettsäuren und Triglyzeriden ².

Die Entstehung des Typ-2 Diabetes ist gekennzeichnet durch die Kombination einer progredienten Insulinresistenz und einer inadäquaten Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas. Eine zunehmende Insulinresistenz der Körpergewebe führt nach dem derzeitigen, pathogenetischen Konzept kompensatorisch zu einer gesteigerten Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas. Kurzfristig kann der Glukosestoffwechsel so durch eine Hyperinsulinämie kompensiert und eine Hyperglykämie verhindert werden ¹³. Auf Dauer ist dieser Regulationsmechanismus nicht beständig und führt zu einer Erschöpfung der β -Zellen des Pankreas. In der Folge kommt es zu einer relativen Hypoinsulinämie und - insbesondere bei progredienter Insulinresistenz - zu einer steigenden Hyperglykämie. Die Entstehung der Insulinresistenz ist durch eine multifaktorielle Genese gekennzeichnet. Häufig treten die verschiedenen, im Folgenden diskutierten Einflussfaktoren (genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse/Lebensstil), welche die Entstehung des Typ-2 Diabetes begünstigen, in Kombination auf ¹⁴.

1 Einleitung

1.2.3.1 Genetische Prädisposition

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Genloci existieren, die die Entstehung des Typ-2 Diabetes begünstigen. Insgesamt erklären die bekannten ca. 60 Risikogenloci aus den genomweiten Assoziationsstudien (GWA-Studien)¹⁵ nur 5-10% der genetischen Prädisposition. Deutlich wurde auch, dass eine Person mit kombiniert auftretenden Risikoallelen ein höheres Risiko hat an einem Typ-2 Diabetes zu erkranken, als eine Person mit nur einem Risikoallel¹⁶. Ein weiterer Hinweis dafür, dass die genetische Prädisposition in der Entstehung des Typ-2 Diabetes eine Rolle spielt, ist der Fakt, dass bei positiver Familienanamnese für einen Typ-2 Diabetes ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko für die Entstehung der Erkrankung besteht¹⁷. Die bis heute identifizierten Diabetes-assoziierten Gene sind zumeist an der Entwicklung des Pankreas, also der β -Zellen und der Insulinsekretion, beteiligt. So ist davon auszugehen, dass vor allem die genetische Beschaffenheit der β -Zellen ausmacht, in welchem Ausmaß der Stoffwechsel auf eine Insulinresistenz reagiert und diese kompensieren kann¹⁸.

Dass die Insulinresistenz auch einer genetischen Komponente unterliegt, konnte an direkten Nachkommen von Probanden mit Typ-2 Diabetes gezeigt werden¹⁹. Bei diesen fand man, ohne dass diese an Typ-2 Diabetes erkrankt waren, eine deutliche Reduktion der Glykogensynthese des Skelettmuskelgewebes²⁰. Dies kann entweder durch eine gestörte Glukoseaufnahme oder eine gestörte Funktion der Hexokinase II, welche die Phosphorylierung der Glukose katalysiert, verursacht werden. Beide Störungen des Glukosestoffwechsels sind bei einem manifesten Typ-2 Diabetes schon frühzeitig auszumachen und eben auch bei Verwandten 1. Grades ohne einen Typ-2 Diabetes²¹.

Genetische Tests als präventive Maßnahme einzuführen, erscheint nicht sinnvoll, da unter anderem gezeigt werden konnte, dass Probanden mit einem Risikoallel für die Entwicklung eines Typ-2 Diabetes (TCFL2) ihr erhöhtes Risiko durch eine entsprechende Lebensstilintervention kompensieren können²².

1.2.3.2 Umwelteinflüsse/Lebensstil

Höheres Alter, hyperkalorische Ernährung, Bewegungsmangel und Überge-

1 Einleitung

wicht sind Einflüsse, die das Risiko an Typ-2 Diabetes zu erkranken, steigern. Die oben genannten Risikofaktoren haben in hohem Maße Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz, welche deutlich mit Adipositas assoziiert ist². Weiterhin haben Zytokine und Proteine, die langfristig unter anderem durch Adipositas oder durch Umwelteinflüsse erhöht sein können, einen negativen Effekt auf die Insulinresistenz und begünstigen dadurch die Entstehung eines Typ-2 Diabetes. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass ein erhöhter Grad an Luftverschmutzung zur Inflammation mit entsprechender Freisetzung von Zytokinen und daraus resultierender gestörter Glukosetoleranz²³ beziehungsweise einem Typ-2 Diabetes führt^{24 25}. Es wird somit deutlich, dass nicht nur eine adäquate Ernährung und Bewegung, sondern auch der Lebensraum eine Rolle in der Prävention chronischer Erkrankungen wie dem Typ-2 Diabetes spielt, da die erwähnten Einflussfaktoren eine dem Typ-2 Diabetes häufig Jahre vorausgehende Insulinresistenz fördern²⁶.

1.3 Insulinresistenz

Die Insulinresistenz spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Typ-2 Diabetes. Definiert ist die Insulinresistenz als die unzureichende Reaktion von Geweben, welche einen Insulinrezeptor exprimieren, auf Insulin²⁷. Von dieser vornehmlich betroffen sind somit Skelettmuskelgewebe, Fettgewebe und die Hepatozyten der Leber. Der genaue Mechanismus der Entstehung der Insulinresistenz ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt²⁶. Als mögliche ursächliche Mechanismen werden erhöhte Konzentrationen an freien Fettsäuren, ektope Fetteinlagerungen in den Organen und der Muskulatur, erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren, eine gestörte Mitochondrienaktivität, -kapazität oder ein verminderter Gehalt an Mitochondrien sowie eine genetische Prädisposition diskutiert^{28, 29, 30}.

1.3.1 Periphere/muskuläre Insulinresistenz

In Skelettmuskelzellen führt die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor über intrazelluläre Signalwege zu einer vermehrten Translokation des GLUT-4

1 Einleitung

Transporters in die Zellmembran, so dass vermehrt Glukose aus dem Blut in die Zelle transportiert werden kann³¹. Ist die Insulinwirkung am Insulinrezeptor der Muskelzelle gestört, kommt es konsekutiv zu einem geringeren Glukoseeinstrom in die Muskelzelle, was eine Erhöhung des Blutglukosespiegels und eine Reduktion des Glykogengehaltes der Skelettmuskulatur zur Folge hat. So konnte gezeigt werden, dass bei Probanden mit Typ-2 Diabetes die Glykogensynthese um 50% im Vergleich zu gesunden Probanden verringert ist²¹. Durch die ohnehin geringere Wirkung des Insulins kommt es zusätzlich zu einer geringeren Expression des GLUT-4 Transporters, was den Glukosetransport in die Muskelzelle weiter verringert²⁰. Als weitere Ursache für die reduzierte Glykogensynthese werden Defekte der Hexokinase II und der Glykogensynthase diskutiert³². Die Hexokinase II dient der Phosphorylierung der in die Myozyten transportierten Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Bei einem Defekt dieses Enzyms fehlt entsprechend Substrat für die Glykogensynthese²⁰. Getriggert wird der pathologische Glukosestoffwechsel bzw. die Insulinresistenz der Muskelzelle durch unter anderem erhöhte freie Fettsäuren (FFA) im Blut²⁸. Insulinresistenz ist assoziiert mit Übergewicht und Bewegungsmangel. Im Fettgewebe kommt es durch eine Überernährung zur Akkumulation intrazellulärer Fettsäuren, was zu einer Hypertrophie der Adipozyten mit inadäquater Insulinwirkung und dadurch ausbleibender Hemmung der Lipolyse führt. In der Folge sind die Serumspiegel der FFA deutlich erhöht, was die Insulinresistenz an Skelettmuskelzellen und Hepatozyten weiter steigert²⁸. Zudem kommt es zu der Speicherung der Triglyzeride als ektope Fetteinlagerungen der verschiedenen Organe des Körpers²⁹. Die gesteigerte intrazelluläre Fetteinlagerung führt zu einer negativen Beeinflussung der Insulinwirkung und anderer Stoffwechselprozesse. So konnte anhand von Muskelbiopsien bei Probanden mit Typ-2 Diabetes eine deutliche Assoziation zwischen dem intramyozellulären Triglyzeridgehalt und der Insulinresistenz gezeigt werden³³. Eine große Rolle bei der Assoziation von Insulinresistenz und intrazellulärer Fetteinlagerung spielt die Konstitution des Probanden. Junge, schlanke und gut trainierte, nicht diabetische Probanden weisen bei zum Teil ähnlichem Gehalt an intramyozellulären Fetteinlagerungen (IMCL) eine deutlich bessere Insulinsensitivität auf, als Proban-

1 Einleitung

den mit Übergewicht, wenig Training und einem Typ-2 Diabetes. Diese Tatsache wird als das „athletische Paradox“ bezeichnet³⁴. Dies kann dadurch begründet sein, dass intensives Training die oxidative Kapazität steigert und damit auch bei gesteigertem Lipidstoffwechsel und konsekutiv gesteigertem oxidativem Stress eine geringere Zellschädigung entsteht³⁵. Da im Vergleich der beiden Gruppen zwar ein ähnlich hoher IMCL-Anteil vorhanden war, sich die beiden aber durch den Gehalt an Diacylglycerol (DAG) und Ceramiden unterscheiden, ist auch davon auszugehen, dass vor allem DAG und Ceramide die Entstehung der Insulinresistenz fördern³⁶. Dabei scheint vor allem der DAG-Gehalt streng assoziiert mit der muskulären Insulinresistenz. So konnte gezeigt werden, dass nach Lipidinfusion bei gesunden und schlanken Probanden die akute, muskuläre Insulinresistenz einherging mit einem Anstieg des DAG-Gehaltes und eine daraus resultierende, deutliche Steigerung der Proteinkinase C θ (PKC θ). Ähnliche Resultate ergaben sich bei adipösen, gesunden und bei adipösen an Typ-2 Diabetes erkrankten Probanden³⁷.

DAG sind Fettsäureester, die in der Triglyzeridsynthese und beim Aufbau von Zellmembranen eine Rolle spielen. Bei einem Überangebot an FFA steigt der intrazelluläre DAG-Gehalt. In der Folge kommt es zur Aktivierung der PKC³⁸, was die Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates 1 und 2 durch Serin-Phosphorylierung hemmt und somit den Insulinsignalweg unterbricht und die Insulinresistenz fördert¹⁴. Die PKC existiert in verschiedenen Isoformen, welche abhängig von ihrer Aktivierung in drei Gruppen eingeteilt werden:

Aktivierung durch Ca^{2+} und DAG: klassische PKC (cPKC: α , β_1 , β_2 , γ)

Aktivierung durch DAG: neue PKC (nPKC: ϵ , δ , η , θ)

Aktivierung unabhängig von Ca^{2+} und DAG: atypische PKC (aPKC: ζ , ι/λ)³⁸.

Ceramide sind Sphingolipide deren Synthese abhängig ist von langkettigen, gesättigten Fettsäuren, welche unvollständiger oxidiert werden als ungesättigte Fettsäuren und somit zur Akkumulation in Gewebe mit folgender Insulinresistenz neigen³⁹. Nicht nur Ceramide, sondern auch ihre Vorstufen haben im Vergleich zu anderen Lipiden *in vitro* und *in vivo* den größten inhibitorischen Effekt auf die Insulinsensitivität^{40, 41, 42}. Ceramide selbst hemmen die Proteinkinase B (Akt), welche für die Aktivierung des Glukosetransportes notwendig ist⁴³.

1 Einleitung

Die Akt 1 ist in Hepatozyten und Myozyten dominierend, wohingegen in Adipozyten vor allem die Akt 2 zu finden ist ⁴⁴. Zudem konnte an verschiedenen Zellreihen gezeigt werden, dass Ceramide verschiedene Kinasen aktivieren (p38, JNK, I κ B Kinase), welche an der Inaktivierung des Insulinrezeptorsubstrates 1 beteiligt sind, in der Folge die Insulinwirkung negativ beeinflussen und damit auch inflammatorische Prozesse fördern ⁴⁵.

1.3.2 Hepatische Insulinresistenz

Die hepatische Insulinresistenz unterliegt, wie die periphere Insulinresistenz, einer multifaktoriellen Genese. Diskutiert werden verschiedene Erklärungsansätze (ektope Fettspeicherung, FFA, Inflammation), wobei zumeist eine Kombination der möglichen Ursachen vorliegt ²⁶. Im Folgenden werden die Erklärungsansätze erläutert und im Verlauf auf die zellulären Mechanismen der hepatischen Insulinresistenz eingegangen.

Hepatische, ektope Lipidspeicherung

Zur ektope Lipidspeicherung kommt es in der Leber im Rahmen der nicht-alkoholischen Steatose der Leber (NAFLD). Diese Konstellation gewinnt in den westlichen Industriestaaten aktuell und zukünftig deutlich an Bedeutung, da man zur Zeit davon ausgeht, dass 2030 nahezu 50% der Bevölkerung der USA von einer NAFLD als Folge von Überernährung betroffen sein wird ⁴⁶. Ein Zusammenhang zwischen der ektope Fetteinlagerung in der Leber und Insulinresistenz konnte in einigen humanen Studien gezeigt werden. Probanden mit einer ausgeprägten, kongenitalen Lipodystrophie beispielsweise wiesen kaum viszerales oder subkutanes Fettgewebe jedoch einen überdurchschnittlich hohen hepatozellulären Fettgehalt auf, was zu einer Steatose und Insulinresistenz führte. Durch eine rekombinante Leptintherapie wurde die Kalorienzufuhr bei den Probanden und in der Folge der Anteil des ektope Lipidgehalts deutlich gemindert, wodurch auch die hepatische Insulinsensitivität regenerierte ⁴⁷. Eine ganze Zeit ist man davon ausgegangen, dass die hepatische Insulinsensitivität besonders durch den Gehalt des viszeralen Fettgehalts bestimmt sei, jedoch

1 Einleitung

ergab sich auch nach chirurgischer Entfernung von viszeralem Fettgewebe kein Anhalt für die Verbesserung der Insulinsensitivität oder Glukosehomöostase, was ein weiteres Indiz für die elementare Rolle der ektopen, hepatozellulären Fettspeicherung in der Pathogenese der hepatischen Insulinresistenz ist ⁴⁸.

FFA

Freie Fettsäuren sind assoziiert mit Übergewicht und führen in der Leber häufig zur Entwicklung einer NAFLD ¹⁴. Triglyzeride, welche häufig bei einer hyperkalorischen Ernährung erhöht sind, werden durch die Lipoproteinlipase in freie Fettsäuren gespalten und von den Hepatozyten aufgenommen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der Transportproteine der FFA an den Hepatozyten zu einer hepatischen Steatose und konsekutiv zu einer Insulinresistenz führt ⁴⁹.

Inflammation

Verschiedene Arbeiten konnten den Zusammenhang zwischen hochkalorischen Mahlzeiten und bestimmten Entzündungsmediatoren nachweisen ⁵⁰. So kam es unter anderem zur postprandialen Erhöhung von Lipopolysacchariden (LPS) insbesondere nach fettreichen Mahlzeiten ⁵¹. Diese transienten LPS-Spitzen können wiederum zu einer signifikanten Erhöhung der Entzündungsmediatoren IL-6 und TNF α führen, welche assoziiert mit Insulinresistenz und der Entwicklung eines Typ-2 Diabetes sind ^{52, 53}.

1.3.2.1 Auswirkungen der hepatischen Insulinresistenz auf den Stoffwechsel

In der Leber führt eine inadäquate Insulinwirkung an den Hepatozyten zu verschiedenen Veränderungen des Stoffwechsels der Leberzelle (**Abb. 1.1**), insbesondere Kohlenhydrat- und Lipid-Homöostase sind davon betroffen ⁵⁴.

1 Einleitung

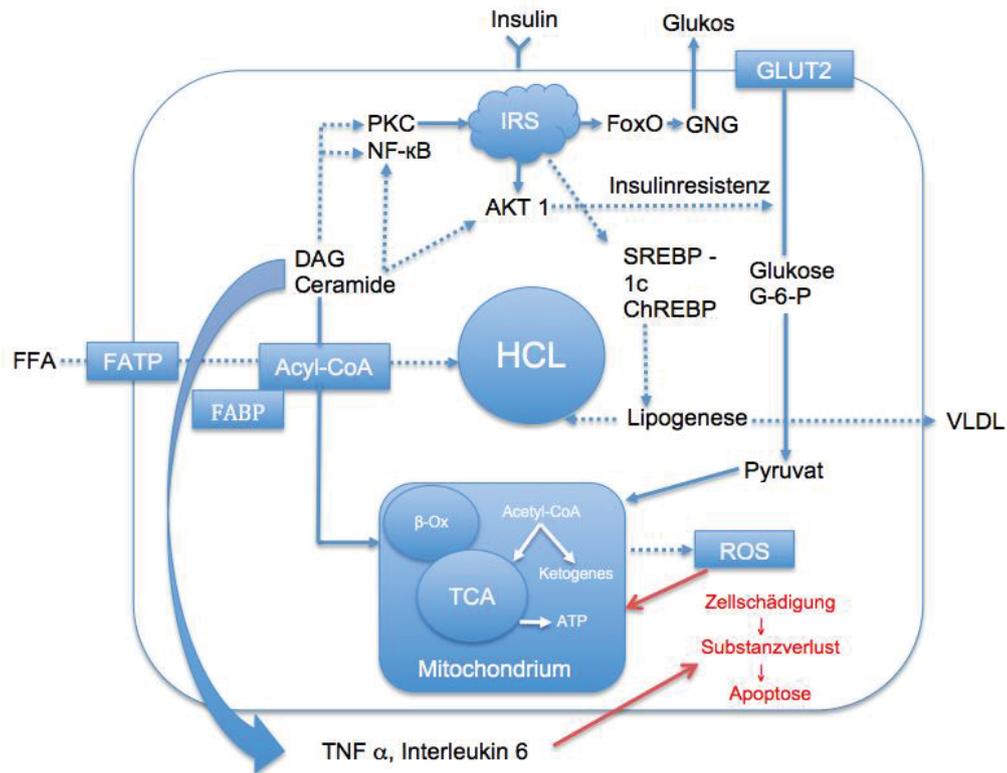


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Hepatozytenstoffwechsels bei Insulinresistenz
Modifiziert nach ²⁹

AKT 1: Proteinkinase B, ATP: Adenosintriphosphat, β -Ox: β -Oxidation, ChREBP: Kohlenhydrat abhängiges Element-bindendes Protein, CoA: Coenzyme A, DAG: Diacylglycerol, FATP: Fettsäuretransport-Protein, FFA: freie Fettsäuren, FoxO1: Fork-head box O1-Protein, GLUT 2: Glukoserezeptortransporter 2, GNG: Glukoneogenese, IRS: Insulin Rezeptor Substrat, G-6-P: Glukose-6-Phosphat, HCL: intrahepatisches Fett, NF- κ B: Nuklear Faktor Kappa B, PGC-1a: PPARg Koaktivator-1a, PKC: Protein Kinase C, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, SREBP-1c: Sterin regulierendes Element-bindendes Protein, TCA: Tricarbonsäurezyklus, TNF α : Tumornekrosefaktor α , VLDL: Very low density lipoproteins

Die verminderte Insulinwirkung führt über den Transkriptionsfaktor FoxO1 zu einer Steigerung der Glukoneogenese in der Leber ⁵⁵, sodass es zu einem Anstieg der Blutglukose kommt ⁵⁶. Weiterhin werden in den Hepatozyten die Glykogenreserven mobilisiert und in Form von Glukose an das Blut abgegeben, was zu einem noch stärkeren Anstieg der Blutglukose führt. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors ChREBP wird durch die erhöhte intrazelluläre Glukose-

1 Einleitung

konzentration aus der Mobilisierung der Glykogenreserven gesteigert und fördert dadurch die Lipogenese, was zu einer vermehrten Freisetzung der Very Low Density Lipoproteine (VLDL) und einer Erhöhung der intrahepatischen Lipide (HCL) führt⁵⁷. Erhöhte HCL bedingen eine starke Aktivierung des Lipidstoffwechsels in den Hepatozyten, sodass Metaboliten des Lipidstoffwechsels wie Ceramide und DAG zur Aktivierung von Entzündungsmediatoren führen und die Insulinwirkung an den Hepatozyten direkt und indirekt zusätzlich negativ beeinflussen^{58, 59}.

Insgesamt führt die hepatische Insulinresistenz zu einer Hyperlipidämie, wobei es besonders zu einem Anstieg der VLDL kommt, und zu einer Hyperglykämie, die durch die Insulinresistenz der Skelettmuskulatur direkt und durch die un gehemmte Glukoneogenese in der Leber indirekt bedingt ist. Da Störungen des Glukose- und Lipidstoffwechsels zum pathologischen Bild der Insulinresistenz führen, werden die veränderten zellulären Mechanismen unter Glukolipotoxizität zusammengefasst²⁹. Vor allem HCL korrelieren negativ mit der Insulinsensitivität der Leber und das gesamte auf Insulin in der Regel sensitive Gewebe⁵⁵. Akkumuliert HCL ohne dass ein Alkoholabusus oder die Einnahme von hepatotoxischen Medikamenten vorliegt, bezeichnet man den Zustand als nicht-alkoholische, hepatische Steatose⁵⁹.

1.3.3 Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

Die NAFLD ist gekennzeichnet durch makrovesikuläre und mikrovesikuläre Lipideinlagerungen in mehr als 5% der Hepatozyten und durch einen Alkoholkonsum, der 20 g pro Tag bei Frauen und 30 g pro Tag bei Männern nicht überschreitet⁶⁰. Die NAFLD umfasst zwei verschiedene pathologische Zustände, die nicht-alkoholische, hepatische Steatose und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Ausdruck der Schwere der Erkrankung ergeben sich aus dem Vorliegen von einer Fibrose, einer Zirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms (HCC)⁶¹.

In den westlichen Industrieländern ist die NAFLD die häufigste chronische Erkrankung der Leber mit einer Prävalenz von 3-24% und zumeist die Ursache für

1 Einleitung

eine milde Erhöhung der Aminotransferasen bis 250 U/l⁶². Im Verlauf der Erkrankung kann es ausgehend von einer nicht-alkoholischen, hepatischen Steatose unter anderem zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis, einer Leberfibrose, einer Leberzirrhose und in selteneren Fällen zu einem HCC kommen. Die Ursache dafür, dass es nur bei ungefähr 50% der Patienten zu einer Progredienz der Krankheit kommt⁶³, ist bis heute nicht geklärt. Zumeist ist die NAFLD assoziiert mit Übergewicht, Typ-2 Diabetes und Dyslipidämie, wobei diese Faktoren gleichzeitig die am stärksten gewichteten Risikofaktoren sind⁶⁴. Insulinresistenz assoziiert außerdem stark mit der NAFLD, jedoch ist bis heute nicht verstanden, ob es durch die Insulinresistenz zu einer nicht alkoholischen Steatose kommt oder ob die nicht alkoholische Steatose der Insulinresistenz vorausgeht⁶³.

Bei bestehendem Übergewicht ist in schätzungsweise 74% der Fälle eine NAFLD diagnostizierbar⁶⁵, was bei einem manifesten Typ 2 Diabetes in 80% der Fälle ist⁶⁶. Patienten, die adipös und an Typ-2 Diabetes erkrankt sind, zeigen in nahezu 100% das Bild der NAFLD⁶⁷. Zudem ist die Sterblichkeit bei Patienten mit Typ-2 Diabetes stärker mit den Folgen der NAFLD als mit den Folgen kardiovaskulärer Störungen assoziiert⁶⁸.

Ein Ungleichgewicht der Aufnahme, der Synthese und der Sekretion der freien Fettsäuren in der Leber führt zu einer kontinuierlichen Anreicherung von Triglyceriden im Leberparenchym und somit zum Bild der Steatose. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze zur genauen Pathogenese der nicht alkoholischen Steatose, wobei keiner dieser Ansätze wirklich gesichert ist. Die Triglyceridanreicherung im Leberparenchym könnte durch gesteigerten Transport von freien Fettsäuren aus dem subkutanen oder viszeralen Fettgewebe, sowie durch postprandial stattfindende Lipolyse der Chylomikronen entstehen⁶⁹. In der Leber selbst kann wie in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben eine gestörte Oxidation der freien Fettsäuren oder eine gesteigerte Extraktion und Triglyceridsynthese diese bedingen. Auch eine zu geringe Sekretion des VLDL durch die Leber kann Ursache für eine entsprechende Triglyceridanreicherung und in der Folge erhöhten HCL sein. Des Weiteren gibt es auch Erklärungsansätze, die inflammatorische Prozesse des Fettgewebes mit einer entsprechend gesteigerten Syn-

1 Einleitung

these verschiedener Entzündungsmediatoren im Zusammenhang mit der Entstehung der NAFLD diskutieren⁷⁰.

Klinisch gewinnt die NAFLD immer mehr an Bedeutung. In den westlichen Industriestaaten ist Übergewicht und Adipositas ein wachsendes Problem, was auch einen Anstieg der Patienten, die an einer NAFLD erkrankt sind, mit sich bringt. Die Reduktion des HCLs bei Patienten mit entsprechendem Krankheitsbild hat einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität und beugt der Entwicklung einer NASH und einer folgenden Zirrhose vor. Dabei führt eine Reduktion des Körpergewichts um 8% bereits zu einer deutlichen Reduktion des HCLs. Eine ausgewogene Ernährung mit ausreichender Bewegung ist daher ideal, um einer NAFLD und einer progredienten Insulinresistenz vorzubeugen⁴⁷.

1.3.4 Rolle der Mitochondrien bei der hepatischen Insulinresistenz

Mitochondrien kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor und werden auch die Kraftwerke der Zelle genannt, da sie im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP) synthetisieren, welches die Grundlage für energieverbrauchende Prozesse im Körper ist. In der mitochondrialen Matrix befindet sich die Pyruvat-Dehydrogenase, die die Verbindung zwischen der zytosolischen Glykolyse und dem mitochondrialen Zitratzyklus bildet. Weiter befinden sich die Enzyme des Zitratzyklus, der Beta-Oxidation der Lipide, ein Großteil des Harnstoffzyklus und der Hämbiosynthese in den Mitochondrien. Mitochondrien dienen zusätzlich der Calcium-Homöostase der Zelle, der Apoptose, der zellulären Proliferation und der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, die für die Atmungskette und somit die ATP-Synthese essentiell sind⁷¹.

Acetyl-CoA ist das Ausgangssubstrat des Zitratzyklus und wird durch die Glykolyse sowie durch die Beta-Oxidation bereitgestellt. Der Zitratzyklus baut Acetyl-CoA in mehreren Schritten zu Kohlendioxid und Wasser ab, wobei die Energie, die in den Einzelschritten des Zitratzyklus entsteht, für die Synthese von ATP in der Atmungskette mit Hilfe eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran genutzt wird. Die Mitochondrienfunktion ist durch die Syn-

1 Einleitung

these von ATP charakterisiert, die die Funktion der Enzyme der Atmungskette widerspiegelt³⁰. Mitochondrien bilden somit die Schnittstelle des Glukose- und Lipidstoffwechsels, da im Rahmen der Beta-Oxidation Fettsäuren und im Rahmen der Glykolyse Glukose das Acetyl-CoA für den Zitratzyklus bereitstellen⁷¹. In verschiedenen Studien wurde die Mitochondrienfunktion in Bezug auf die intrazellulären Triglyzeridspeicher im Muskel untersucht und festgestellt, dass diese bei erhöhten intrazellulären Triglyzeridspeichern verändert ist^{72, 73}. Die folgende Abbildung (**Abb. 1.3**) gibt einen Überblick über die Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei erhöhten intrahepatischen Triglyzeridspeichern.

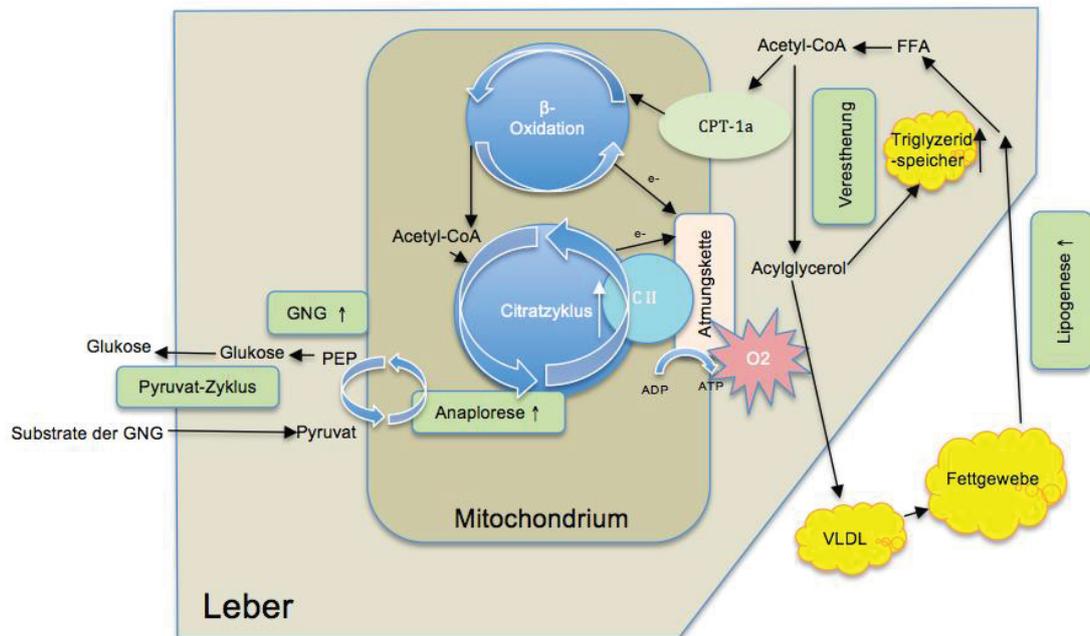


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der hepatischen Mitochondrienfunktion bei nicht-alkoholischer Steatose

Modifiziert nach⁷⁴

Acetyl-CoA: Acetyl Coenzym A, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, C II: Komplex II der Atmungskette, CPT-1a: Carnitine Palmitoyl Transferase I a, e⁻: negativ geladenes Elektron, FFA: freie Fettsäuren, GNG: Glukoneogenese, O₂: Sauerstoff, PEP: Phosphoenolpyruvat, VLDL: Very Low Density Lipoprotein

Ein erhöhtes Angebot an freien Fettsäuren steigert die Aufnahme dieser in die Leber. Diese werden durch die Carnitine Palmitoyl Transferase I in die Mito-

1 Einleitung

chondrien transportiert und über die Beta-Oxidation in den Zitratzyklus geschleust. Die Durchsatzrate des Zitratzyklus ist bei hohen intrahepatischen Triglyzeridspeichern verdoppelt und auch die Rate der anaplerotischen Reaktionen, also Reaktionen deren Produkte in den Zitratzyklus eingespeist werden ⁷⁵, ist um 55% verdoppelt ⁷⁴. In Anwesenheit hoher intrahepatischer Triglyzeridspeicher kommt es somit zum Anstieg der anabolen Stoffwechselwege, was auf einen gesteigerten Energiebedarf der Zellen schließen lässt. Es wird davon ausgegangen, dass der hohe Anteil an Triglyzeriden und der gesteigerte Fettsäureabbau zu der Aktivierung inflammatorischer Substanzen, also der Aktivierung von Zytokinen wie IL-6 und TNF α , führt ⁷⁶ und dadurch zur Zellschädigung der Hepatozyten und der Mitochondrien selbst führt. Die Hepatozyten haben im Zuge der Zellschädigung einen höheren Energiebedarf, um dem entzündlichen Geschehen entgegenzuwirken. So konnte festgestellt werden, dass Mitochondrien bei Patienten mit Übergewicht als auch bei Patienten mit Typ-2 Diabetes insgesamt an Anzahl, Größe und Masse verringert sind und der hepatische ATP-Turnover auch geringer ist als in einem gesunden Kollektiv ^{30, 77, 78}. Beide Patientenkollektive sind prädisponiert für erhöhte hepatische Triglyzeridspeicher bzw. einen erhöhten HCL. Ein Erklärungsansatz wäre der oben beschriebene starke Anstieg der anabolen Stoffwechselwege durch die insgesamt verschlechterte Mitochondrienfunktion. Die verminderte Mitochondrienfunktion wäre durch die gestörte Homöostase des Lipidstoffwechsels zu erklären. Das Überangebot an Fettsäuren könnte dabei die Oxidation dieser im Mitochondrium stimulieren was über die Dauer dazu führt, dass es zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen kommt. Sauerstoffradikale schädigen die mitochondrialen Enzyme und die DNA, was letztendlich zur mitochondrialen Dysfunktion führt und auch die mitochondriale Morphologie beeinträchtigt ⁷¹.

1.4 Bereits veröffentlichte Arbeiten zum Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, ATP-Gehalt der Leber und Fettgehalt der Leber

1.4.1 Untersuchungen im Tiermodell

In verschiedenen Tiermodellen wurden bereits verschiedene Aspekte des Zusammenhangs von Leberfettgehalt, ATP-Gehalt/ -Synthese und Insulinwirkung

1 Einleitung

untersucht.

Vendemiale et al. zeigten, dass oxidativer Stress in Mitochondrien, die aus Hepatozyten von Fettlebern von Ratten isoliert wurden, zu einem verringertem Gehalt an der F₀F₁-ATP-Synthase und in der Folge zu einem verringerten ATP-Gehalt führt. Auf den Zusammenhang von oxidativem Stress, der durch eine Lipidinfiltation der Hepatozyten hervorgerufen wurde, konnte aufgrund eines reduzierten Gehalts an Glutathion in den Mitochondrien geschlossen werden⁷⁹. Glutathion ist das wichtigste Antioxidanz der Zellen und schützt die einzelnen Organellen vor freien Radikalen⁸⁰. Der erhöhte Lipidgehalt der Hepatozyten führt in diesem Fall direkt zu der Schädigung der mitochondrialen Matrix durch die gesteigerte Oxidation von Lipiden und dem damit verbundenem vermehrten Aufkommen von freien Radikalen⁷⁹ und indirekt durch die negative Beeinflussung des Transports von Glutathion vom Zytosol der Zelle in die mitochondriale Matrix⁷⁹.

1.4.2 Untersuchungen beim Menschen

Es konnte bereits an Probanden in vivo ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und einem erhöhten Lipidgehalt der Leber gezeigt werden, und in einigen Arbeiten wurde gleichzeitig auch der ATP-Stoffwechsel untersucht. So korreliert der BMI invers mit dem hepatischen ATP-Gehalt, und ein reduzierter hepatischer ATP-Gehalt wurde signifikant häufiger in übergewichtigen Probanden gefunden als in normalgewichtigen Kontrollen⁸¹.

Schmid et al. zeigten, dass Probanden mit einem Typ-2 Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollen einen um 42% geringeren Leber-ATP Gehalt und eine um 29% und 28% geringere periphere und hepatische Insulinsensitivität haben. Dabei gab es bei keinem der beiden Gruppen einen Anhalt für vorausgegangene Pathologien der Leber (Hepatitis, hepatozelluläres Karzinom usw.)⁷⁷. Weiterhin konnte aufgrund des Hüftumfanges auch ein Zusammenhang zwischen einem gestörten Leberstoffwechsel und dem abdominellen Fettgehalt herausgearbeitet werden⁷⁷.

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Übergewicht und NAFLD

1 Einleitung

auch in einer nicht diabetischen Population von 60 Probanden mit Insulinresistenz, gemessen über einen Insulin-Toleranztest, korrelieren. In übergewichtigen Probanden mit NAFLD wurden höhere Spiegel von Phosphormetaboliten in der Leber mittels ^{31}P -MRS gemessen, als bei schlanken Probanden mit NAFLD oder gesunden, schlanken Kontrollen. Ebenso wies die Gruppe mit Übergewicht und NAFLD die schlechteste Insulinsensitivität auf, gefolgt von den schlanken Probanden mit NAFLD ⁸². Interessanterweise wiesen die schlanken Probanden mit NAFLD die meisten Veränderungen der Phosphormetaboliten auf.

Dies könnte Ausdruck einer vermehrten und noch effizienten Gegenregulation in diesen Probanden sein. So zeigten Koliaki et al., dass hepatische Mitochondrien übergewichtiger Probanden mit und ohne NAFLD eine 4,3 bis 5-fach erhöhte, maximale Respirationsrate aufwiesen, als die hepatischen Mitochondrien der gesunden Kontrollen ⁷⁸. Dem gegenüber zeigten die Mitochondrien von übergewichtigen Probanden mit einer NASH eine um 31% bis 40% verringerte maximale Respirationsrate. Die verringerte Respirationsrate war zudem assoziiert mit einer gesteigerten Insulinresistenz und mit einem vermehrten Auftreten von Metaboliten, die oxidativen Stress erzeugen. Zudem wiesen sie eine geringere antioxidative Kapazität und häufiger Anzeichen für inflammatorische Aktivität auf. Damit weist die Leber eine gewisse „mitochondriale Flexibilität“ auf, die zunächst noch eine gesteigerte kompensatorische Kapazität aufweist und erst mit zunehmender Dauer der Störung zu dekomensieren scheint ⁷⁸.

1 Einleitung

Studie	Studiendesign, Studienkohorte	Messmethode		Ergebnisse	
		Leber-ATP-/ Fettgehalt	Insulinsensitivität	Leber-ATP-Gehalt	Assoziation Insulinsensitivität
Szendroedi et al. 2009 ¹⁰²	Querschnittstudie (n=27) T2D vs. BMI- und altersangeglichene Kontrollen und junge, schlanke Kontrollen	¹ H/ ³ P MRS	HEC mit EGP	↓ γ-ATP und Pi in T2D vs. Kontrollgruppen (23-26%)	Inverse Korrelation γ-ATP und Insulinsensitivität (r= -0,665; p=0,010) nach Adjustierung für HCL
Sharma et al. 2009 ⁸²	Querschnittstudie (n=60) Gruppen: 1. 20 mit NAFLD und BMI > 25 kg/m ² 2. 20 mit NAFLD und BMI < 25 kg/m ² 3. 20 ohne NAFLD und BMI < 25 kg/m ²	³¹ P MRS, Sonographie	SITT u. HOMA-IR	Gruppe 1 PME/γATP ↑↑ Gruppe 2 PME/γATP ↑ Gruppe 3 PME/γATP -	Gruppe 1 Insulinresistenz ↑↑ Gruppe 2 Insulinresistenz ↑ Gruppe 3 -
Schmidt et al. 2011 ⁷⁷	Querschnittstudie (n=17) T2D vs. BMI- und altersangeglichene Kontrollen	³¹ P MRS	HEC mit EGP	fATP ↓ in T2D als in Kontrollgruppe (42%)	Positive Korrelation zwischen fATP und Insulinsensitivität (r=0,77; p=0,002) nach Adjustierung für HCL
Koliaki et al 2015 ⁷⁸	Querschnittstudie (n=53) Übergewichtige mit NASCH oder mit NAFLD vs. Übergewichtige ohne NAFLD und gesunde, schlanke Kontrollen	Leberbiopsie/ high resolution respirometry ex vivo	HEC mit EGP	ROR (respiratory control ratio) CON > OBE NAFL- > OBE NAFL+ > OBE NASH	Reduzierte Insulinsensitivität in NASH vs. Übergewichtige ohne NAFLD und gesunde schlanke Kontrollen

1.5

Tab. 1-2 Assoziation zwischen Leber-ATP-Gehalt, NAFLD und Insulinresistenz – bereits veröffentlichte Daten

ATP: Adenosintriphosphat, EGP: endogene Glukoseproduktion, fATP: ATP-Fluss, HCL: hepatozellulärer Lipidgehalt, HEC: hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp mit Tracer-Dilutionstechnik zur Bestimmung der EGP, HOMA-IR: homeostasis model assessment – insulin resistance, NAFLD: nicht-alkoholische Steatosis hepatitis, NASH: nicht-alkoholische Steatohepatitis, Pi: anorganisches Phosphat, SITT: short insulin tolerance test, T2D: Typ-2 Diabetes

1.5 Hypothese und Zielsetzung

Die Insulinresistenz als initialer, pathogenetischer Schritt in der Entwicklung des Typ-2 Diabetes ist sowohl in der Peripherie als auch in der Leber zu beobachten und dort häufig vergesellschaftet mit einer nicht-alkoholischen Steatose. Neben einem Überangebot an freien Fettsäuren wird auch eine Störung des ATP-Stoffwechsels als Grundlage für die hepatische Fettakkumulation und Insulinresistenz diskutiert, andererseits kann der mitochondriale Stoffwechsel bei einer hepatozellulären Fetteinlagerung im Sinne einer NAFLD zumindest temporär kompensieren.

Daher ist die Hypothese dieser Arbeit, dass eine Reduktion des ATP-Gehaltes als Maß der mitochondrialen Kapazität in der Leber unabhängig von einer Steatose mit einer Insulinresistenz assoziiert ist.

Fragestellungen waren:

1. Besteht eine Assoziation des Leber-ATP-Gehaltes mit Insulinresistenz in einer nicht diabetischen Population?
2. Gibt es Einflussfaktoren, die diese Beziehung bedingen?
(u.a. Fettverteilung, Leberfett, Insulinsekretion)

Eventuelle Subgruppen sollen anhand verschiedener Einflussfaktoren bei vorhandener Assoziation des hepatischen ATP- und Fettgehalts identifiziert werden und somit vielleicht das Profil des prädiabetischen Zustandes herausgearbeitet werden.

Um dieses Ziel zu erreichen wurden bei 146 zufällig ausgewählten Nicht-Diabetikern die folgenden Interventionen durchgeführt:

- klinisch, chemisches Labor
- oraler Glukosetoleranztest
- Interview zum Lebensstil
- MRT-Untersuchung zur Ermittlung des Leber-ATP-Gehalts und des Leber- und Ganzkörperfettgehalts

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

2.1 Studienkollektiv

2.1.1 Nationale Kohorte (Machbarkeitsstudie)

Die Nationale Kohorte ist ein Projekt, welches durch verschiedene Forschungseinrichtungen Deutschlands (Helmholtz-Gemeinschaft, Universitäten, Leibniz-Gemeinschaft) initiiert wurde und seit dem Jahr 2011 mit ersten Machbarkeitsstudien umgesetzt wird ⁸³. Bei diesem Projekt handelt es sich um eine repräsentative Langzeitbevölkerungsstudie, welche zum Ziel hat, Volkskrankheiten (Krebserkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes, Demenzerkrankungen, Infektionskrankheiten) und deren Risikofaktoren zu identifizieren und aus diesen Erkenntnissen effiziente Präventionsstrategien zu entwickeln. Um dieses Projekt umzusetzen, sollen 200.000 Menschen im Alter zwischen 20 und 69 Jahren deutschlandweit medizinisch untersucht und zu ihrem Lebensstil befragt werden. Die medizinische Untersuchung beinhaltet eine Blutentnahme, so dass auch Laborparameter, die mit verschiedenen Volkskrankheiten im Zusammenhang stehen, beobachtet oder identifiziert werden können. Die Probanden der Nationalen Kohorte sollen an dieser Untersuchung im Abstand von fünf Jahren über zehn bis zwanzig Jahre teilnehmen.

2.1.2 Studiendesign

Im Rahmen der Machbarkeitsstudien für die Nationale Kohorte wurden von Juli bis November 2011 im Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf 146 Probanden medizinisch untersucht, zu ihrem Lebensstil befragt und es wurde bei einem Teil der Probanden ein Ganzkörper-MRT durchgeführt. Die in dieser Querschnittsstudie gewonnenen Daten sind die Grundlage dieser Arbeit. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf geprüft und von dieser zugelassen (Zulassungsnummer: 3619).

2.1.3 Probandenkollektiv- und rekrutierung

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch das Einwohnermeldeamt Düsseldorf und über eine Werbeanzeige. Das Einwohnermeldeamt der Stadt Düsseldorf wählte Bewohner der Stadt Düsseldorf im Alter zwischen 20 und 69 Jahren zufällig aus. Diese erhielten ein Einladungsschreiben und Informationen zu der Machbarkeitsstudie mit der Bitte der Terminvereinbarung zur Studienteilnahme. Nach dieser Terminvereinbarung wurde eine postalische Terminbestätigung mit weiterem Informationsmaterial über die Machbarkeitsstudie und mit einem Leitfaden über das richtige Verhalten vor und während der Studienuntersuchung versendet. Potenzielle Probanden, die sich gegen die Teilnahme an der Studie entschieden, sind nicht in der Dropout-Rate enthalten. Die Daten der teilnehmenden Probanden wurden mithilfe von Codes pseudonymisiert. Jedem Probanden wurde eine eindeutige Ziffernkennung für die Studienteilnahme zugeordnet und eine weitere interne Ziffernkennung für die Zuordnung zu Protokolldaten (Laborparameter, MRT-Aufnahmen, Bioprobenprotokolle).

2.2 Methoden

2.2.1 Ablauf der Studientage

Der Studienablauf wurde in zwei Tage gegliedert. Zu dem ersten Studientag sollten die Probanden nüchtern erscheinen, damit nach ausführlicher Aufklärung ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) durchgeführt werden konnte. Vor dem oGTT wurden die anthropometrischen Daten (Größe, Gewicht, Taillen- und Hüftumfang) erfasst sowie Blutdruck und Puls gemessen. Zwischen den venösen Blutentnahmen des oGTT erfolgte die erneute Messung des Blutdrucks und des Pulses. Nach der Durchführung des oGTT am ersten Studientag erhielten die Probanden ein Frühstück, um die Gefahr der reaktiven Hypoglykämie zu vermeiden. Weiterhin wurde ein standardisiertes Interview geführt und den Probanden wurde ein Fragebogen zur Ermittlung von Kontraindikationen einer MRT-Untersuchung ausgehändigt. Wenn sich keine Kontraindikationen für die Durchführung der MRT/MRS-Untersuchung ergaben, fand diese am zweiten Studientag statt, der individuell vereinbart wurde. In der Regel lagen ca. sieben

Tage zwischen den beiden Studientagen, damit eine Validierung von Kontraindikationen für die MRT-Untersuchung anhand von medizinischen Vorbefunden gewährleistet werden konnte.

Jeder Teilbereich der Studie (Anthropometrie, Interview, Blutentnahme, Probenverarbeitung, MRT/MRS-Untersuchung) erfolgte nach einer standardisierten Arbeitsanweisung bzw. einer Standard Operating Procedure (SOP).

2.2.2 Anthropometrie

Zur Erfassung der anthropometrischen Daten wurden Größe und Gewicht des bis auf die Unterwäsche entkleideten Probanden mit der Messstation Seca 285 erfasst. Die Größe wurde auf 0,5 cm genau, das Gewicht auf 0,1 kg genau ermittelt. Aus den ermittelten Werten, Größe und Gewicht, wurde der Body Mass Index (BMI) mit folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Körpergröße [m]}^2$$

Zusätzlich wurden der Taillenumfang und der Hüftumfang gemessen. Dabei wurde der Taillenumfang genau in der Mitte zwischen Beckenkamm und letzter Rippe des Probanden parallel zum Boden auf 0,5 cm genau gemessen. Der Hüftumfang wurde an der prominentesten Stelle des Gesäßes parallel zum Boden auf 0,5 cm genau gemessen.

2.2.3 Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen und diastolischen Blutdruckes erfolgte nach Riva Rocci mit einer Blutdruckmanschette am Oberarm des sitzenden Probanden nach einer zehnminütigen Ruhepause.

2.2.4 Ausführliche Anamnese und Fragebogen zum Lebensstil

Bei dem durchgeführten Interview handelte es sich um ein standardisiertes Interview, sodass die Fragen, die Antworten und die entsprechende Reihenfolge vorgegeben waren. Vor der Durchführung des Interviews wurden die Probanden über die Durchführung und den Inhalt aufgeklärt und ihr Einverständnis eingeholt. Anschließend wurde das Interview durchgeführt und mithilfe eines Mikrofons und eines Computers aufgenommen. Die Probanden wurden zum ei-

nen intensiv zu ihrer Lebensweise befragt (Ernährung, Nikotinkonsum, Bewegung) und zum anderen wurde eine ausführliche medizinische Anamnese durchgeführt. Dabei wurde besonders auf zuvor gestellte Diagnosen von chronischen Krankheiten, den Diagnosezeitpunkt und die Therapie geachtet.

2.2.5 Blutentnahme, Probenverarbeitung und-lagerung

Die Blutentnahme erfolgte nachdem die gefasteten Probanden die Fragen eines Bioprobenprotokolls beantwortet hatten und sich daraus keine Kontraindikationen ergaben. Absolute Kontraindikationen waren eine Hämophilie sowie die Nahrungsaufnahme und die Aufnahme von Getränken außer Wasser weniger als zehn Stunden vor der geplanten Blutentnahme, relative Kontraindikation war die Einnahme blutverdünnender Medikamente. Ergab sich aus den gestellten Fragen keine Kontraindikation und hatte der Patient der Blutentnahme zugestimmt, wurde eine Venenverweilkanüle in eine Vene der Ellenbeuge gelegt und die Basisblutentnahme durchgeführt. Weitere Blutentnahmen folgten zum Zeitpunkt 0 min (direkt vor Start des oGTT), 30 min, 60 min und 120 min nach Start des oGTT über die Venenverweilkanüle. Zwischen den Blutentnahmen wurde die Venenverweilkanüle mit einem Mandrin verschlossen, nach der letzten Blutentnahme wurde diese sofort entfernt und die Punktionsstelle entsprechend versorgt.

Die verwendeten Blutentnahmeröhrchen wurden vor der Nutzung mit Aufklebern beklebt, welche die NK-Nummer, die Entnahmezeit und den Verwendungszweck eindeutig machten.

Folgende Werte wurden aus den Blutentnahmen erhoben:

Basisblutentnahme (- 45 min): kleines Blutbild, klinische Chemie (Kreatinin, GOT, GPT, GGT, Triglyzeride, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Ferritin, hsCRP), Freie Fettsäuren, HbA_{1c}, Vollblut für die DNA-Analytik

0 min Entnahme (vor Start des oGTT): Glukose, C-Peptid, Insulin, Plasma für Metabolomics-Analysen, Serum für Immunanalysen, RNA für Genexpressionsanalysen

30 min Entnahme: Glukose, C-Peptid, Insulin

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

60 min Entnahme: Glukose, C-Peptid, Insulin

120 min Entnahme: Glukose, C-Peptid, Insulin,

Klinische Chemie:

Die Blutabnahme erfolgte in zwei 8,5 ml und ein 2,5 ml Serumröhrchen, welches zweimal um 180° direkt nach der Blutabnahme geschwenkt wurde. Nach aufrecht stehender Lagerung bei Raumtemperatur für 30-45 min erfolgte die 15-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 1800 g. Das Serum wurde in ein Analyse-röhrchen pipettiert und innerhalb von maximal 2 Stunden in das Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf transportiert. Die Lagerung erfolgte bei 6°C initial im Kühlschrank und für den Transport in einer Kühlbox.

Kleines Blutbild:

Die Blutabnahme erfolgte in ein 2 ml EDTA-Röhrchen das direkt nach der Blut-abnahme zweimal um 180° geschwenkt wurde. Anschließend erfolgte die Lage-rung bei 6°C im Kühlschrank und der Transport der Blutprobe gemeinsam mit dem Serum zur Bestimmung der klinischen Chemie in einem Kühlbehälter in das Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf zur Bestimmung des kleinen Blutbildes.

DNA:

Die Blutabnahme erfolgte in ein 2 ml und ein 3 ml K-EDTA-Röhrchen, diese wurden direkt nach der Blutabnahme zweimal um 180° geschwenkt. Aus dieser Probe wurden direkt nach der Blutabnahme 200 µl in ein Kryoröhrchen pipet-tiert, das vom Institut für Umweltmedizinische Forschung weiter verarbeitet wurde. Anschließend erfolgte die Lagerung der Probe im Gefrierschrank bei -20°C.

Freie Fettsäuren:

Zur Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte die Befüllung eines Mikropro-bengefäßes (EDTA mit 40 µl Orlistat-Stammlösung⁸⁴) mit 1 ml Probandenblut. Bis zur Probenverarbeitung am selben Tag erfolgte die Lagerung auf Eis.

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

HbA_{1c}:

Ein 3 ml K-EDTA-Röhrchen wurde zur Bestimmung des HbA_{1c} verwendet, dieses wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Insulin und C-Peptid:

Die Blutabnahme erfolgte in ein 3,5 ml Serumröhrchen, welches zweimal um 180° direkt nach der erfolgten Blutabnahme geschwenkt wurde. Anschließend erfolgte die Lagerung aufrecht stehend bei Raumtemperatur für 15 min und darauf die 30-minütige Zentrifugierung bei 15°C mit 2000 g. Das Probandenserum wurde auf drei Kryoröhrchen verteilt, wobei jedes einzelne mindestens 100 µl enthalten musste.

Die Proben zur Bestimmung des Insulins wurden entweder bei +4°C für 48 h gelagert und verarbeitet oder bis zu 12 Wochen bei – 20°C gelagert und weiter verarbeitet. Das Probandenserum zur Bestimmung des C-Peptids wurde noch am Tag der Entnahme weiterverarbeitet.

Glukose:

Die Blutabnahme erfolgte mit einer 1 ml Einmalspritze, das Probandenblut wurde zur Glukosebestimmung in ein Mikro-Probengefäß mit Kaliumfluorid-Heparinat gefüllt. Vor der Lagerung bei Raumtemperatur im Stehen wurde die Probe ca. 10-mal um 180° geschwenkt.

Metabolomic:

Die Blutabnahme erfolgte in ein 3 ml EDTA Röhrchen und wurde anschließend 30 Minuten auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 15°C und 2000 g. Der Überstand wurde mittels Pipette auf zwei Kryoröhrchen verteilt und bei -20°C eingefroren.

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

Immunmarker:

Die Blutentnahme erfolgte in ein 8,5 ml Serumröhrchen. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 30 bis 45 Minuten im Stand gelagert und anschließend bei 4°C und 2000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette auf zwei Kryoröhrchen aufgeteilt und anschließend bei –80°C eingefroren.

RNA:

In dieses Röhrchen (PAXgene™ Blood RNA) wurden 2,5 ml Blut entnommen, durch mind. 10-maliges Schwenken vermischt, in einer lichtgeschützten Box für 2 h gelagert und anschließend zur weiteren Verarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt bei -20°C eingefroren.

Oraler Glukosetoleranztest (oGTT):

Der oGTT wurde nach einer 12-stündigen Fastenzeit am Morgen des ersten Studientages durchgeführt. Initial erfolgte, wie oben angegeben, die Blutentnahme zum Zeitpunkt 0. Danach tranken die Probanden eine standardisierte Zuckerlösung (Dextro-O.G.T.-Saft mit 75 g Glukose in 300 ml Flüssigkeit) in einem vorgegebenen Zeitraum von 5 min. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min und 120 min nach Beendigung der Einnahme der Zuckerlösung. Während der Durchführung des oGTT waren die körperliche Betätigung, die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Rauchen untersagt. Ergab sich bei den Probanden der Anhalt einer Hypoglykämie oder einer Unverträglichkeit, wurde der oGTT vorzeitig abgebrochen.

Aus den entnommenen Blutproben wurden die Blutglukosekonzentration, die Insulinkonzentration und die C-Peptid-Konzentration ermittelt. Die Werte galten der Ermittlung einer Störung des Glukosestoffwechsels bzw. eines Diabetes mellitus sowie zur Berechnung der Insulinsensitivität und der Insulinsekretion ⁸⁵.

2.2.6 Laborbestimmungen

Die Bestimmung der Triglyzeride, des Gesamtcholesterins, des HDL-Cholesterins, des LDL-Cholesterins und des kleinen Blutbildes erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Triglyzeride:

Die Bestimmung der Triglyzeride erfolgte mittels des Cobas® c Systems TRIGL der Firma Roche. Bei der Messung erfolgt die enzymatische Spaltung der Triglyzeride durch eine Lipoproteinlipase in Glycerin und drei freie Fettsäuren. Anschließend oxidiert Glycerin durch das Enzym Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol zu einem roten Farbstoff. Der rote Farbstoff wird photometrisch gemessen und ist proportional zur Triglyzeridkonzentration.

Cholesterin (Gesamt, HDL und LDL):

Die Bestimmung des Cholesterins erfolgte ebenfalls mittels des Cobas® c Systems TRIGL der Firma Roche (Heiligenhaus, Deutschland).

Gesamtcholesterin:

Initial erfolgte die Spaltung des Cholesterinesters in freies Cholesterin und Fettsäuren durch die Cholesterinesterase. Danach kam es durch die Cholesterinoxidase zur Oxidation des freien Cholesterins zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid reagierte mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu einem roten Farbstoff, welcher durch die Extinktionszunahme photometrisch gemessen wurde und proportional zur Cholesterinkonzentration ist.

HDL-Cholesterin:

Der Probandenprobe wurden zunächst Mg^{2+} und Phosphorwolframsäure zugefügt, sodass es zur Ausfällung aller enthaltenen Bestandteile bis auf das HDL-Cholesterin kam. Das Vorgehen beschreibt eine Präzipitationsmethode. Die weiteren Schritte und die abschließende photometrische Messung erfolgten analog zu den Schritten, die im Abschnitt „Gesamtcholesterin“ beschrieben sind.

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

LDL-Cholesterin:

Das LDL-Cholesterin wurde mittels Friedwald-Formel bestimmt:

$LDL = GC - HDL - Triglyzeride/5$ (mg/dL).

Bei Triglyzeridwerten > 400 mg/dL konnte das LDL-Cholesterin nicht bestimmt werden.

Freie Fettsäuren:

Zur quantitativen Bestimmung der freien Fettsäuren wurde der enzymatische Farbtest NEFA-HR(2) der Firma Wako (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland) verwendet⁸⁶. Dabei wurden freie, nicht veresterte Fettsäuren durch das Enzym Acyl-CoA Synthetase zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure gespalten unter Mitwirkung von Coenzym-A und Adenosin-5- Triphosphat-Dinatriumsalz. Acyl-CoA wurde durch das Enzym Acyl-CoA-Oxidase zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Im Anschluss wurde Peroxidase, 3-Methyl-N-Ethyl-N-Anilin hinzugefügt, sodass sich ein blau-violetter Farbkomplex bildete. Anhand der Absorptionsmessung konnte die Konzentration der freien Fettsäuren quantifiziert werden.

Kleines Blutbild:

Die Bestimmung des kleinen Blutbildes erfolgte durch das Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf mittels des Sysmex XE-2100. Dabei erfolgte die Bestimmung der Anzahl der Erythrozyten und Thrombozyten in der gleichen Messkammer, wobei die Differenzierung anhand des Größenunterschiedes erfolgte. Dazu wurden 4µl der Blutprobe mit einem Verdünnungsreagenz gemischt und die Mischung durch eine Kappillaröffnung gesogen. Die Kappillaröffnung diente als Messeinheit, da beim Durchtritt der Zellen ein elektrischer Impuls ausgelöst wurde. Die Höhe des elektrischen Impulses war abhängig von der Zellgröße, sodass die unterschiedlichen Impulse gemessen und jeweils der Anzahl der Erythrozyten oder Thrombozyten zugeordnet werden konnten.

Die Bestimmung der Granulozyten und Leukozyten erfolgte mittels Durchflusssytometrie. Dafür wurden zunächst die Erythrozyten der Blutprobe durch

Zugabe von Stromatolyser-fb lysiert.

HbA_{1c}:

Die Bestimmung des HbA_{1c} erfolgte durch die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromographie im VARIANT™ II Hämoglobin Analysesystem. Dabei wurde das nicht-glykolysierte Hämoglobin vom glykolysierten Hämoglobin getrennt und anschließend wurden die relativen Anteile in % bestimmt.

Blutglukose:

Die Blutglukose Messung erfolgte mittels eines EPOS 5060 Analyzer der Firma Eppendorf. Dabei reagiert die Glukose mit dem Enzym Glukoseoxidase zu D-Glukonsäure und H₂O₂. Im folgenden Schritt kommt es zur Oxidation von Wasserstoffperoxid und es entsteht ein elektrisches Signal an einer Platinelektrode, welches proportional zu der in der Probe vorhandenen Glukose ist.

C-Peptid:

Die quantitative Bestimmung des C-Peptids erfolgte mittels IMMULITE 2000 C-Peptid, einem Zweiphasen Chemilumineszenz immunometrischem Assay⁸⁶ (Fa. Siemens Healthcare, Deutschland) .

Für die Messung wurden 25 µl des Probandenserums benötigt. Die Festphase des Zweiphasen Assays bestand aus einer Kugel mit einer Beschichtung aus monoklonalem (Maus) Anti-C-Peptid-Antikörper. Die Flüssigphase bestand aus alkalischer Phosphatase gewonnen aus Rinderdarm, welche in Pufferlösung an einen monoklonalen Maus anti-C-Peptid Antikörper gebunden konjugiert war. Zur Bestimmung des C-Peptids wurden die zwei Phasen und das Probandenserum für 30 Minuten inkubiert, sodass sich ein Antikörper-Sandwich-Komplex zwischen dem Probandenserum und den Antikörpern der festen und flüssigen Phase bildete. Anschließend erfolgte eine Waschung, sodass nur die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe zurückblieben. Diesen wurde eine Chemilumineszenz beigefügt, welche nach Umsetzung durch alkalische Phosphatase, welche an die Antikörper gekoppelt war, umgesetzt wurde, sodass eine Lumi-

neszenz proportional zum gebundenem Enzym generiert und gemessen werden konnte.

Ergebnisse wurden in ng/ml angegeben. Der von der Firma angegebene Median lag bei 2,2 ng/ml.

Insulin:

Für die Messung wurden 100 µl des Probandenserums benötigt.

Analog zur Bestimmung des C-Peptids⁸⁶ wurde zur Bestimmung des Insulins der Immulite 2000 Analyzer verwendet. Die Inkubationszeit beträgt hierbei 60 min. Die feste Phase (Kugel) war mit einem murinen monoklonalen anti-Insulin-Antikörper beschichtet und der flüssigen Phase (alkalische Phosphatase aus Rinderdarm) waren zwei Antikörper beigefügt, ein polyklonaler (Schaf) Anti-Insulin-Antikörper und ein monoklonaler (Maus) Anti-Insulin-Antikörper.

Ergebnisse wurden in µIU/ml angegeben. Als Referenzwert wurde ein Median von 9,3 µIU/ml durch die Firma angegeben.

Adiponektin (total und HMW), Interleukin 6 und 18:

Die Bestimmung der 4 Parameter erfolgte durch Sandwich-Elisa nach den Vorgaben des Protokolls der jeweiligen Firma. Dabei wurde zur Bestimmung des Interleukin 6 (IL-6) das System Quantikine® HS (R&D Systems, Minneapolis, USA), zur Bestimmung des Interleukin 18 (IL-18) das IL-18 ELISA (MBL, Nagoya, Japan) und zur Bestimmung des Adiponektins das Total und High-molecular-weight Adiponectin (ALPCO Diagnostics, Salem, USA) verwendet. HMW ist dabei die high-molecular-weight Form, welche die biologisch aktive Form ist⁸⁷.

2.2.7 MRT/MRS-Untersuchung

Die MRT/MRS-Untersuchungen wurden mithilfe eines 3 Tesla MRTs von Philips (3T Philips Achieva, Best, The Netherlands) am zweiten Studientag durchgeführt. Am ersten Studientag wurde mittels eines Fragebogens geprüft, ob keine Kontraindikationen für die Teilnahme an dieser Untersuchung bestehen (z.B.

zurückliegende Verletzung mit Metallsplitter, bestimmte Zahnfüllungen oder Endoprothesen) und dies durch einen ärztlichen Mitarbeiter des Deutschen Diabetes-Zentrums Düsseldorf begutachtet. Wenn keine Kontraindikation für die Untersuchung bestand und das Einverständnis des Patienten vorlag, wurde die ca. 90 min dauernde Untersuchung freigegeben und durchgeführt.

Ziel der Untersuchung war die Ermittlung des Ganzkörperfettgehaltes, des Leberfettgehaltes und des Leber-ATP-Gehaltes.

2.2.7.1 Bestimmung des Ganzkörperfettgehaltes mit ^1H -MRT

Die Quantifizierung des subkutanen und viszeralen Fettgewebes, also die Bestimmung des Ganzkörperfettgehaltes, erfolgte mittels ^1H -Magnetresonanzspektroskopie. Dazu wurden transversale Mehrschichtsbilder in T_1 -Wichtung mittels Spin-Echo-Technik mit einem Turbofaktor von 7, einer Echozeit von 38 ms und einer Repititionszeit zwischen 400 und 510 ms angefertigt. Die Aufnahmezeit betrug ca. 15 Minuten.

2.2.7.2 Bestimmung des Leberfettgehaltes mit ^1H -MRS

Die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie erlaubt die nicht invasive Quantifizierung des HCLs⁸⁸. Der Leberfettgehalt wurde mithilfe einer 16-Kanal phasengesteuerten Empfängerspule (Philips Healthcare) ermittelt. Nachdem Übersichtsaufnahmen in drei Ausrichtungen aufgenommen wurden, wurden transversale T_2 -gewichtete Aufnahmen mit mehrzeiligen 2D Spin-Echo-Aufnahmen (Repetitionszeit [TR]/Echozeit [TE] = 2081/80 ms; Field of View [FOV]: 450 x 345 mm²) erstellt, um die genaue Position des Diaphragmas und damit der Leber zu identifizieren. Die Aufnahmen wurden mithilfe von Atemkommandos synchronisiert und aufgenommen. Im Folgenden wurde ein Voxel von 3 x 3 x 2 cm³ in der Leber positioniert und der Leberfettgehalt mittels ^1H -MRS ermittelt (TR = 4s, TE = 10 ms, Number of signal averages [NSA] = 32). Bei der Positionierung des Voxels wurde darauf geachtet, dass dieses nicht im Bereich der Gallenblase oder großer Blutgefäße positioniert wurde. Damit der verfettete Anteil der Leber genau bestimmt werden konnte, wurde eine Reihe von nicht-Wasser-verdrängenden und Wasserverdrängenden Spektren erstellt⁸⁸. Die Korrektur erfolgte, da die Fett-Peaks (CH_2 und CH_3) in einer gesunden Leber von dem

H₂O verdrängt werden und so die Ergebnisse verfälscht würden.

2.2.7.3 Bestimmung des Leber-ATP-Gehaltes mit ³¹P-MRS

Die Bestimmung des Leber-ATP-Gehaltes wurde mithilfe einer ³¹P-Magnetresonanzspektroskopie und einer zirkulären (14 cm im Durchmesser) ³¹P-Spule (transmit-receive coil, Philips Healthcare, Best, Netherlands) durchgeführt, da mit dieser Methode Veränderungen in der Phosphatzusammensetzung von Gewebe detektiert werden kann ⁸⁹. Die ³¹P-MRS wurde immer nach der ¹H-MRS durchgeführt, da im Rahmen der ¹H-MRS die Lokalisation der Leber bereits erfolgt war. Anschließend wurde ein Voxel von 6 x 6 x 6 cm³ in der Leber positioniert, wobei genau darauf geachtet werden musste, dass kein Muskelgewebe, größere Gallengänge oder Blutgefäße innerhalb des Voxels lagen. So wurden Probanden mit einem zu hohen Phosphokreatin (PCr) -Peak oder einen qualitativ zu schwachen γ -ATP-Peak (PCr-Peak > 4 und/oder γ -ATP-peak < 4) nicht in die Auswertung einbezogen, da in dem Fall eine Positionierung in Muskelgewebe wahrscheinlich ist. Nun wurde mittels image selected in vivo spectroscopy (ISIS) eine ³¹P-MRS erstellt ⁹⁰. Dazu wurde ein 5,42 ms hyperbolisch sekant adiabatischer Puls (Anregungs-Bandweite: 1,5 kHz, TR = 4 s, NSA = 192, spektrale Weite: 3000Hz, Aufnahmedauer = 13 min) zur Anregung der Phosphatmoleküle und ein 4,22 ms hyperbolischer Umkehrpuls für die Schnittauswahl (hyperbolische Umkehrbandbreite = 2,95 kHz) verwendet. Die Messung wurde ohne Atemkommandos durchgeführt. Zur Signalverstärkung wurde die Protonen-Entkopplung und der Nuclear-Overhauser-Effekt [NOE] genutzt (Entkopplung: WALTZ -4, Ausgleichfrequenz: -100 Hz, NOE: Mischzeit = 1,5 s, schmalbandige Bestrahlung) ⁹¹. Um die Sensitivität der Spule zu messen, wurden Spektren einer externen Referenz (Trimethylphosphit), die sich im Gehäuse der Spule befand, separat aufgenommen (spektrale Weite: 3000 Hz, TR = 8 s, NSA = 16, Aufnahmezeit: 2 min). Bei der Referenzmessung wurde kein Gebrauch von der Protonen-Entkopplung und dem NOE gemacht.

2.2.8 Indizes zur Bestimmung der Insulinsensitivität, der hepatischen Extraktion und der hepatischen Steatose

2.2.8.1 OGIS (Oral Glucose Insulin Sensitivity)

Der OGIS ist ein Index für Insulinsensitivität und validiert für einen 2-Stunden oGTT mit 75 g Glukose. Ermittelt wird dieser mit einem komplexen mathematischen Model, das anhand der Übereinstimmung mit der Gesamtkörper-Insulinsensitivität gemessen als M-Wert im hyperinsulinämischen, euglykämischen Clamp, dem Goldstandard zur Ermittlung der Insulinsensitivität, entwickelt und validiert wurde. Die Glukosekonzentration muss zu den Zeitpunkten 0, 60 und 120 min und die Insulinkonzentration zu den Zeiten 0 und 60 min bestimmt werden. Der Index des OGIS ist analog zu den Werten eines Insulin-Clamps, dem Goldstandard zur Ermittlung der Insulinsensitivität ⁹².

2.2.8.2 QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index)

Der QUICKI ist ebenfalls ein Index zur Bestimmung der Insulinsensitivität und wird aus dem Nüchternglukosewert und Nüchterninsulinwert berechnet. Auch dieser Index ist eine gute Alternative eines Clamps. Die Berechnung erfolgt mittels folgender Formel, G0 und I0 stehen für Nüchternglukose und Nüchterninsulin ⁹³:

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{[\log(I(0)) + \log(G(0))]}$$

2.2.8.3 ISlcomp (Matsuda-Index)

Der ISlcomp ist ein Index zur Berechnung der Insulinsensitivität anhand eines 2-Stunden oGTT mit 75 g Glukose und entwickelt von Matsuda und De Fronzo. Dabei werden die Nüchternglukosewerte, die Nüchterninsulinwerte und die Mittelwerte der Glukose- und Insulinwerte zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min, 90 min und 120 min (Gmean bzw. Imean) mit einbezogen. Er wird wie folgt berechnet ⁹⁴:

$$\text{ISlcomp} = \frac{10000}{\sqrt{G0 \times I0 \times G\text{mean} \times I\text{mean}}}$$

2.2.8.4 Hepatische Insulinextraktion

Die hepatische Insulinextraktion zeigt an wie viel Insulin durch die Leber im Sinne des First-Pass-Effektes verstoffwechselt wird. Da das C-Peptid unabhängig vom hepatischen Stoffwechsel ist, berechnet sich die hepatische Insulinextraktion als Prozentanteil des gesamten, sezernierten Insulins vom sezernierten C-Peptid. Um die hepatische Insulinextraktion zu bestimmen, wurde die folgende Formel verwendet ⁹⁵:

$$HepInsExt = 1 - \left(\frac{AUC\ Ins}{AUC\ CP} \right)$$

2.2.8.5 Hepatic Steatosis Index (HSI)

Der HSI ist ein Index, um die Wahrscheinlichkeit zum Vorliegen einer NAFLD zu ermitteln. Dieser errechnet sich aus der ALT, der AST und dem BMI der Probanden. Zu berücksichtigen ist, ob ein Diabetes mellitus vorliegt oder es sich um eine Probandin handelt, dann werden in der Formel jeweils zwei addiert:

$$HSI = 8 * \frac{ALT}{AST} + BMI + 2 (DM) + 2 (weiblich)$$

Bei einem Wert von < 30 und >36 kann mit einer Sensitivität von 93% eine NAFLD ausgeschlossen bzw. mit einer Spezifität von 92% eine NAFLD diagnostiziert werden. Bei einem Wert zwischen 30 und 36 kann eine NAFLD nicht ausgeschlossen werden. Dieser Index ist mithilfe einfacher Basisdiagnostik zu ermitteln und vor allem geeignet, um beim Vorliegen gewisser Risikofaktoren (Adipositas, Stoffwechselerkrankungen, laborchemische Erhöhung der Leberwerte) eine weiterführende Diagnostik bezüglich einer NAFLD einzuleiten und ggf. frühzeitig zu intervenieren ⁹⁶.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die klinische Datenbank wurde mit Hilfe von Microsoft Word und Excel erstellt

und verwaltet. Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm SAS Version 9.4 TS Level 1M0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) erstellt. Die Darstellung der Daten erfolgt, soweit nicht gesondert gekennzeichnet, als Mittelwert und Standardabweichung, ansonsten als Median und 25. bzw. 75. Quartil. Für die Analyse gingen Parameter, die nicht normalverteilt waren, logarithmiert ein, um einer Normalverteilung am ehesten zu entsprechen. An statistischen Tests zum Vergleich zweier Gruppen wurde für normal-verteilte Variablen der Student t-Test für unverbundene Stichproben und für nicht-normal-verteilte Variablen der Wilcoxon-signed rank Test verwendet. Zum Vergleich dreier Gruppen wurde der ANOVA-Test mit Fischer-LSD-Adjustierung verwendet. Die Korrelationsanalysen zu Zusammenhängen zwischen dem Leber-ATP-Gehalt und den in der Studie erhobenen, möglichen Einflussfaktoren wurden nach Spearman berechnet, da nicht alle Werte normal-verteilt waren. Dabei werden die Werte, anders als bei der Pearson-Korrelation, nach Rängen geordnet und gehen entsprechend in die Berechnung der Korrelation mit ein. Des Weiteren wurden in linearen Regressionsanalysen die Assoziation zwischen dem ATP-Gehalt der Leber und der Insulinresistenz unter Berücksichtigung von möglicherweise beeinflussenden Kovariablen untersucht, um damit die Assoziationen unabhängig von diesen betrachten zu können. Differenzen mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

2.3 Material

Blutentnahme:

- Desinfektionsspray (Bode Cutasept ®, Artikelnummer: 976820, Bode Chemie 22525 Hamburg, Deutschland)
- Tupfer (Pur Zellin 4x5cm unsteril Rolle zu 500 Stück, Artikelnummer: 3548129, Paul Hartmann AG, 45659 Recklinghausen, Deutschland)
- Cosmopor IV Kanülenpflaster (Fixierpflaster, 8 x 6 cm, 50 Stück, Artikelnummer: 602895, Paul Hartmann AG, 45659 Recklinghausen, Deutschland)
- Einmalhandschuhe (Latex Gentle Skin Sensitive PF unsteril 100 Stück,

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

Artikelnummer: V83003M, Rösner-Mautby Meditrade GmbH, 83088 Kiefersfelden, Deutschland)

- Venenverweilkanüle (Vasofix[®] Safety, 22G (blau), Artikelnummer: 4268091S-01, 20G (pink), Artikelnummer: 4268113S-01, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)
- Venenverweilkanülenverschluss (Mandrin Vasofix[®], 22G, Artikelnummer: 4215095, 20G, Artikelnummer: 4219104, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)
- Multiadapter (BD Vacutainer[®] Multisample Luer-Adapter, Artikelnummer: 367300, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Einmalhalter (BD Halter für die Blutentnahme mit BD Vacutainer[®] Röhrchen, Artikelnummer: 364815, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Einmalspritzen (Injekt[®], 2ml: Artikelnummer: 2057895, 5ml: Artikelnummer: 2057903, 10ml: Artikelnummer: 2057926, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)

Abnahmeröhrchen:

- Serumröhrchen (BD Vacutainer[®] SSTTM II Advance Röhrchen, Artikelnummer: 366882, Volumen: 2,5 ml, Artikelnummer: 367953, Volumen: 8,5 ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer[®] EDTA-Röhrchen, Artikelnummer: 368841, Volumen: 2 ml, Artikelnummer: 368856, Volumen: 3 ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Glukoseröhrchen (Mikro-Probengefäß 1,3 ml, Fluorid Heparin/Glukose, gelb, Artikelnummer: 41.1505.015, Sarstedt AG & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland)
- RNA (PAXgene[™] Blood RNA Röhrchen, Artikelnummer: 762165, Volumen 2,5ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Freie Fettsäuren (Mikro-Probengefäß 1,5 ml, mit Schraubverschluss, Artikelnummer: 710020, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Olden-

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

dorf, Deutschland) versetzt mit 20 µl K₂-EDTA und 40 µl-Orlistat-Stammlösung

- Versorgungsröhrchen (Probenröhrchen 1,5 ml, farblos, Artikelnummer: 710020, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
+ Schraubverschlüsse, grün mit Dichtring, Artikelnummer.: 710033, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
+ Schraubverschlüsse, blau mit Dichtring, Artikelnummer: 710032, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Versorgungsröhrchen (5 ml, 75 x 13 mm, PS, Artikelnummer: 55.475.001, Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland)

Blutversorgung:

- Pipette (Eppendorf Research[®] plus 100-1000 µl, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (ep T.I.P.S. Reloads 50-1000 µl, Artikelnummer: 0030 073.460, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Probenröhrchen 1,5 ml, farblos (Artikelnummer: 710020, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Schraubverschlüsse (grün mit Dichtring, Artikelnummer.: 710033 und blau mit Dichtring, Artikelnummer: 710032, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Cryovials, 2 ml, freistehend, steril, Artikelnummer:710513, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Deckelfarbe (Cap-insert, rot, Artikelnummer: 710531 Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Plexiglasröhrchen (Röhrchen 5 ml, 75 x 13 mm, PS, Artikelnummer: 55.475.001, Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland)

Bestimmungskits und Lösungen:

- OGTT: Glukoselösung ACCU-CHEK[®] Dextrose O.G-T. (Roche Diagnos-

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

tics GmbH, 42579 Heiligenhaus, Deutschland)

- Freie Fettsäuren: NEFA-HR(2) (Wako Chemicals GmbH, 41468 Neuss, Deutschland)
- Orlistat 25µg/ml Stammlösung, bestehend aus einer Verdünnung von zerriebenem Orlistat (Xenical®, Roche Pharma GmbH, 79639 Grenzach-Wyhlen, Deutschland) mit physiologischem NaCl in einer Konzentration von 1:4
- K2-EDTA 1,8 mg/ml Stammlösung (Artikelnummer ED2P-100G, Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland)
- Quantikine® HS, High Sensitivity ELISAs, Human – IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- IL-18 ELISA (MBL, Nagoya, Japan)
- Total und High-molecular-weight Adiponectin (ALPCO Diagnostics, Salem, USA)

Geräte:

- Zentrifuge (Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, 78532 Tuttlingen, Deutschland)
- Insulin und C-Peptid: IMMULITE® 2000 (Global Siemens Healthcare Headquarters Siemens AG, 91052 Erlangen, Deutschland)
- Triglyceride: Cobas® c Systeme TRIGL (Roche Diagnostics GmbH, 42579 Heiligenhaus, Deutschland)
- HbA1c: VARIANT™ II Hämoglobin-Analysesystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80901 München, Deutschland)
- Glukose: Epos 5060 (Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Blutbild: Sysmex XE-2100 (Sysmex Deutschland GmbH, 22848 Nordstedt, Deutschland)
- Messgerät SECA 285 dp (seca austria, 22089 Hamburg, Deutschland)
- SECA 201 Umfangsmessband (seca austria, 22089 Hamburg, Deutschland)

2 Studienkollektiv, Methoden und Material

MRT/MRS:

- MRT 3T Philips Achieva (Philips MedicalSystems, Best, Niederlande)
- ^{31}P Spektrum: 14 cm zirkulare ^{31}P Oberflächen Spule, transmit-recv coil (Philips GmbH Market DACH, 20001 Hamburg, Deutschland)
- ^1H Spektrum: 16-channel phased-array Empfänger Spule (Philips GmbH Market DACH, 20001 Hamburg, Deutschland)

Softwarepakete:

- Interview: DAIMON Computer Programm
- Programm No23 Recorder 2.0 (85376 Massenhausen, Deutschland)
- NUTS (Acorn NMR Inc, Livermore, CA, USA)
- SAS Version 9.4 TS Level 1M0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

3 Ergebnisse

3.1 Studienkohorte

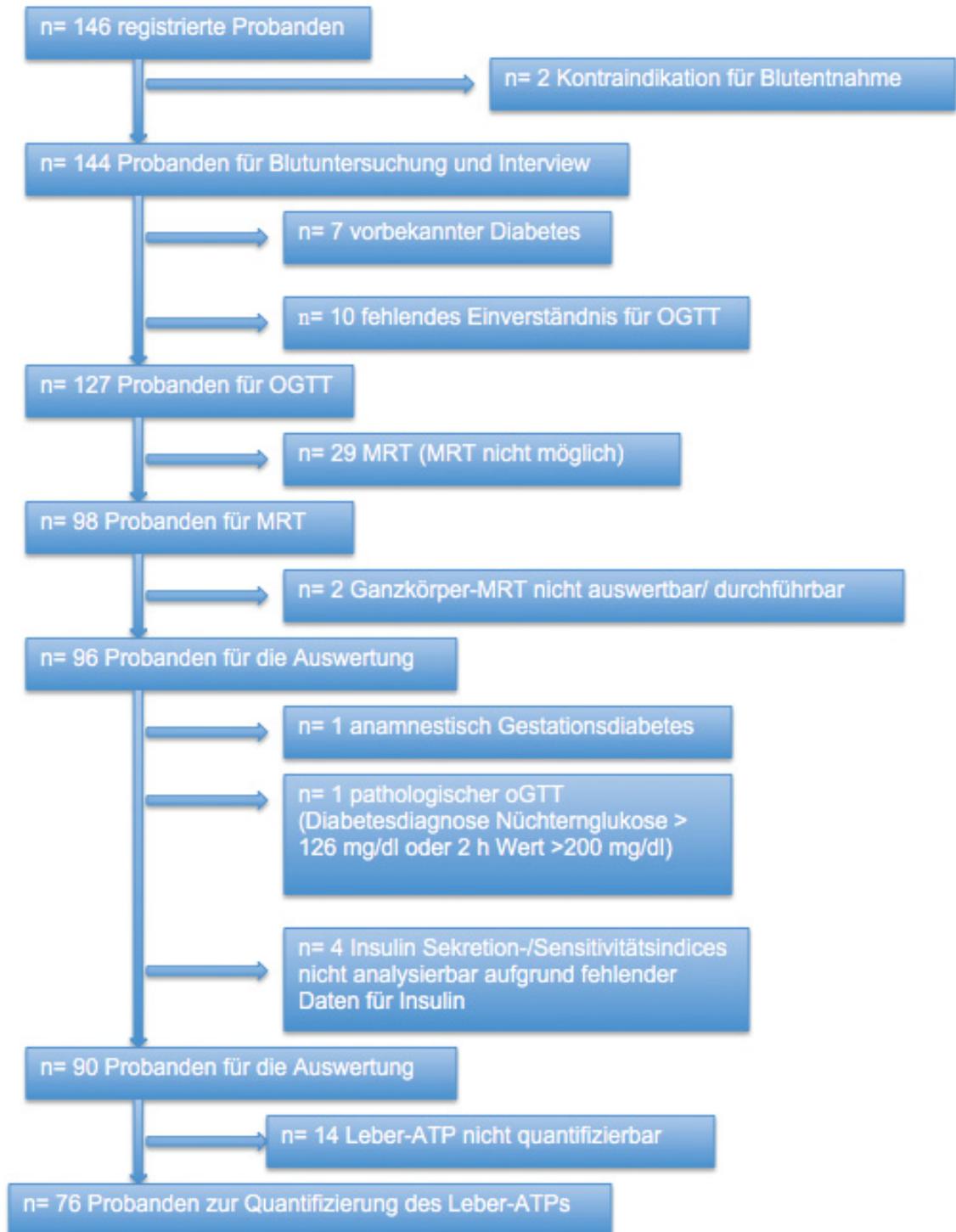


Abb. 3.1 Zusammensetzung des Studienkollektivs

3 Ergebnisse

Die Kohorte bestand insgesamt aus 146 Probanden (**Abb. 3.1**), welche durch das Einwohnermeldeamt rekrutiert werden konnten. Bei zwei der Probanden bestand eine Kontraindikation für die Teilnahme an der Blutentnahme, sodass 144 Probanden an der Blutentnahme und dem standardisierten Interview teilnehmen konnten. Zehn Probanden stimmten im weiteren Verlauf der Durchführung des oGTT nicht zu und sieben weitere Probanden erfüllten bei vorbekanntem Diabetes mellitus die Einschlusskriterien nicht. Insgesamt wurden bei 127 Probanden der oGTT und das standardisierte Interview durchgeführt, wobei sich bei 29 Probanden eine Kontraindikation zur Durchführung der MRT-Untersuchung ergab.

Bei insgesamt 98 Probanden wurde eine Ganzkörper-MRT-Untersuchung durchgeführt, wobei zwei Untersuchungen nicht ausgewertet bzw. durchgeführt werden konnten. Die Ganzkörper-MRT von 96 Probanden konnte ausgewertet werden. Von diesen ergab sich bei einer Probandin anamnestisch ein Gestationsdiabetes, sodass dies zum Ausschluss aus der Auswertung führte. Bei einem weiteren Probanden ergab die Durchführung des oGTT den Nachweis eines Diabetes mellitus und vier Probanden konnten aufgrund fehlender Daten zur Insulinsekretion nicht in die Auswertung eingeschlossen werden, bei weiteren 14 Probanden war die Auswertung des Leber-ATP-Gehaltes nicht möglich. Dies lag zumeist an der Fehlpositionierung der Spule und an zum Teil unvollständiger Daten trotz adäquater Spulenpositionierung für den Leber-ATP-Gehalt. Insgesamt konnten somit 76 Probanden in die Studiauswertung eingeschlossen werden.

3.2 Probandencharakteristika

Von den ausgewerteten 76 Probanden waren 39% männlich und 61% weiblich (**Tab. 3-1**), das mittlere Alter des Probandenkollektivs betrug 57 Jahre, der BMI betrug im Durchschnitt 25,4 kg/m², was Übergewicht entspricht⁹⁷. Der Mittelwert des Gesamtcholesterins war erhöht. Der Anteil des subkutanen Fettgewebes war mit 20 x 10³ cm³ deutlich höher als der Anteil des viszeralen Fettgewebes mit 3,2 x 10³ cm³. Der durchschnittliche hepatozelluläre Fettgehalt lag un-

3 Ergebnisse

terhalb des Grenzwertes für eine hepatische Steatose ($< 5,5\%$ ⁶⁰). Die mittleren Blutglukosewerte im oGTT lagen im Normbereich, wobei bei 4 Probanden eine gestörte Nüchternglukose, bei 7 Probanden eine gestörte Glukosetoleranz und bei 2 Probanden eine Kombination dieser beiden diagnostiziert wurde. Auch der mittlere HbA_{1c} lag im Normbereich. Die Insulinsensitivität, die anhand des OGIS, des ISIcomp bzw. des QUICKI ermittelt wurde, entsprach Mittelwerten nicht diabetischer Populationen.

3.3 Konzentrationen der Phosphormetabolite in der Leber

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Phosphormetabolite der Leber wurde der Gehalt an γ -ATP, anorganischem Phosphat (Pi), Phosphormonoester (PME) und Phosphordiester (PDE) mittels ³¹P-MRS erhoben (**Tab. 3-1**).

Der γ -ATP-Gehalt lag im Mittel bei 2,59 mmol/l, was einem Wert entspricht, der deutlich über dem γ -ATP-Gehalt diabetischer Populationen aus anderen Arbeiten mit gleicher Bestimmungsmethode liegt. Ähnlich verhielt es sich mit dem Gehalt des Pi. Für die PME und PDE ergaben sich Werte, die in anderen Arbeiten jeweils für diabetische und nicht diabetische Probanden ermittelt wurden, wobei der PME- und PDE-Gehalt dabei verglichen zu anderen Studienpopulationen eher im unteren Bereich der ermittelten Mittelwerte lagen.

3 Ergebnisse

n	Basischarakteristika	Mean ± SD bzw. Median und IQR
76	n (männlich/weiblich)	76 [27; 49]
76	Alter (Jahren)	57 [45; 69]
76	BMI (kg/m ²)	25,4 [22,0; 28,8]
76	Taille (cm)	87 [76; 98]
76	Gesamtcholesterin (mg/dl)	225 [210; 247]
74	HDL (mg/dl)	65 [56; 79]
72	LDL (mg/dl)	148 [126; 167]
75	GOT/AST (U/l)	26 [17; 36]
75	GPT/ALT (U/l)	22 [11; 32]
75	g-GT (U/l)	26 [2; 50]
53	Triglyzeride (mg/dl)	92 [68; 137]
76	FFA (µmol/l)	494 [406; 640]
76	Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	20 [16; 25]
76	Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	3,2 [1,6; 4,7]
76	Hepatozellulärer Fettgehalt (%)	1,6 [0,6; 4,1]
76	HbA _{1c} (%)	5,5 [5,1; 5,9]
76	Nüchtern glukose (mg/dl)	74 [70; 82]
76	2h Glukose (mg/dl)	92 [77; 102]
76	Nüchterninsulin (mU/l)	6,1 [4,6; 9,1]
76	2h Insulin (mU/l)	38,8 [26,1; 67,7]
76	NGT/IFG/IGT/IFG+IGT	63/4/7/2
76	OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	452 [399; 500]
76	Hepatische Extraktion (%)	67,7 [62,1; 72,8]
76	ISIcomp	6,39 [4,79; 9,03]
76	QUICKI	0,46 [0,42; 0,49]
76	Adaptations Index (au)	0,45 [0,7; 0,52]
76	γ-ATP (mmol/l)	2,59 [2,44; 3,08]
76	Pi (mmol/l)	1,99 [1,61; 2,31]
76	PME (mmol/l)	2,01 [1,57; 2,34]
76	PDE (mmol/l)	7,68 [6,45; 9,51]
76	IL-6 (pg/ml)	1,00 [0,55; 1,56]
76	Adiponektin total (ng/ml)	6306 [5028; 9667]
76	Adiponektin HMW (ng/ml)	3115 [2228; 5553]
76	IL-18 (pg/ml)	215 [173; 278]

Tab. 3-1 Basischarakteristika

Angegeben sind Mittelwert (Mean) b± Standardabweichung (SD) bzw. Median und 25./75.

Perzentile. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, γ-GT: Gamma-

Glutamyl-Transferase, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-

Transaminase, HDL: High-Density-Lipoprotein, LDL: Low-Density Lipoprotein, n: Anzahl, PDE:

Phosphordiester, PME: Phosphormonoester

3 Ergebnisse

3.4 Assoziationen mit dem Leber ATP-Gehalt

Im nächsten Schritt wurde die Assoziation zwischen Parametern des Leber-ATP-Gehaltes (γ -ATP, Pi und γ -ATP/Pi) und den erhobenen Indices zur Ermittlung der Insulinsensitivität (OGIS, QUICKI, ISlcomp) mittels Korrelationsanalyse analysiert und die Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet (**Tab. 3-2**).

Der γ -ATP-Gehalt der Leber korrelierte sowohl mit dem BMI als auch mit dem Anteil an subkutanem Fettgewebe, nicht jedoch mit den Parametern der Insulinsensitivität. Hepatisches Pi und γ -ATP/Pi korrelierten weder mit dem Fettgehalt der Leber oder mit dem Anteil an subkutanem Fettgewebe, noch mit der Insulinsensitivität.

Variablen	γ ATP	Pi	γ ATP/Pi
BMI (kg/m ²)	0.21*	0,04	0,16
Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	0.23*	0,11	0,15
Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	0,06	-0,13	0,17
Hepatozellulärer Fettgehalt (%)	0,15	0,15	-0,02
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	-0,02	0,04	-0,08
ISlcomp	-0,11	0,1	-0,14
QUICKI	0,05	0,15	-0,06

Tab. 3-2 Korrelationen mit dem Leber ATP-Gehalt

Angegeben ist der Spearman-Korrelationskoeffizient sowie der zugehörige p-Wert, gekennzeichnet: * < 0,05; **<0,01. ATP: Adenosintriphosphat, BMI: Body Mass Index, ISlcomp: OGIS: oral glucose insulin sensitivity, Pi: anorganisches Phosphat, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

3.5 Unabhängige Prädiktoren des Leber-ATP-Gehaltes

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Korrelationen durch potenzielle Störfaktoren (Confounder) beeinflusst waren, wurde eine lineare Regressionsanalyse mit unterschiedlichen Regressionsmodellen durchgeführt, die die wesentlichen Störfaktoren Alter, Geschlecht und Körperfettgehalt berücksichtigten. Da verschiedene Maße des Körperfettgehaltes auch eine unterschiedliche Fettverteilung widerspiegeln, wurde im Modell 4 jeweils ein Modell mit Adjustierung auf den BMI (Modell 4a) und ein Modell mit Adjustierung auf den Leberfettgehalt

3 Ergebnisse

(Modell 4 b) berechnet. Die Regressionsanalysen wurden mit den drei abhängigen Variablen γ -ATP (**Tab. 3-3**), Pi (**Tab. 3-4**) und γ -ATP/Pi (**Tab. 3-5**) berechnet, angegeben sind jeweils der Regressionskoeffizient β mit dem dazugehörigen p-Wert. Nicht-normalverteilte Variablen gingen dabei in logarithmierter Form in die Analyse ein.

Wie in der zuvor durchgeführten Korrelationsanalyse zeigte sich im einfachen Modell eine positive Assoziation zwischen dem γ -ATP-Gehalt der Leber und dem Anteil des subkutanen Fettgewebes (**Tab. 3-3**). Diese Assoziation war bereits nach Adjustierung auf das Geschlecht nicht mehr nachweisbar. Ebenso war die im einfachen Modell beobachtete Assoziation zwischen der Insulinsensitivität, ermittelt durch den QUICKI, und dem γ -ATP-Gehalt der Leber nach Adjustierung auf das Geschlecht nicht mehr nachweisbar, obwohl die Assoziation im vollen Modell nach Adjustierung auf den Leberfettgehalt zumindest grenzwertig vorhanden war ($p=0,07$).

Dem gegenüber wiesen das anorganische Phosphat Pi und der Quotient γ -ATP/Pi in der linearen Regressionsanalyse weder im einfachen Modell noch nach entsprechender Adjustierung eine Assoziation zu einem der bestimmten Parameter auf.

Variabel	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4 a		Modell 4b	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Subkutanen Fett (10^3 cm^3)	0,31	0,03	0,25	0,13	0,2	0,21	0,08	0,8	0,14	0,39
Viszerales Fett (10^3 cm^3)	0,04	0,48	0,14	0,05	0,05	0,51	-0,01	0,94	-0,02	0,87
OGIS ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)	-0,003	0,76	-0,0005	0,59	0,0002	0,79	0,001	0,29	0,001	0,28
In ISlcomp	-0,01	0,89	-0,03	0,72	-0,01	0,94	0,04	0,65	0,06	0,48
QUICKI	1,95	0,17	1,61	0,25	1,54	0,25	2,08	0,13	2,52	0,07

Tab. 3-3 Unabhängige Prädiktoren des γ -ATP

Angegeben sind der Regressionskoeffizient β und der zugehörige p-Wert. Modell 1: einfaches Modell, Modell 2: Adjustiert für Geschlecht, Modell 3: adjustiert für Geschlecht und Alter, Modell 4a: adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI, Modell 4b: adjustiert für Geschlecht, Alter und Leberfettgehalt, In: Logarithmus naturalis, OGIS: oral glucose insulin sensitivity, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

3 Ergebnisse

Variabel	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4 a		Modell 4b	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Subkutanes Fett (10^3 cm^3)	0,11	0,40	0,02	0,90	-0,01	0,93	-0,14	0,64	-0,06	0,71
Viszerales Fett (10^3 cm^3)	-0,04	0,49	0,01	0,89	-0,07	0,36	-0,12	0,20	-0,13	0,12
OGIS ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	0,0003	0,75	0,0001	0,9	0,0006	0,51	0,0009	0,39	0,001	0,21
In ISlcomp	0,06	0,44	0,04	0,55	0,06	0,43	0,07	0,36	0,11	0,16
QUICKI	1,55	0,22	1,28	0,31	1,24	0,32	1,37	0,3	1,87	0,15

Tab. 3-4 Unabhängige Prädiktoren des Pi

Angegeben sind der Regressionskoeffizient β und der zugehörige p-Wert. Modell 1: einfaches Modell, Modell 2: Adjustiert für Geschlecht, Modell 3: adjustiert für Geschlecht und Alter, Modell 4a: adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI, Modell 4b: adjustiert für Geschlecht, Alter und Leberfettgehalt, In: Logarithmus naturalis, OGIS: oral glucose insulin sensitivity, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

Variabel	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4 a		Modell 4b	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Subkutanes Fett (10^3 cm^3)	0,13	0,19	0,14	0,20	0,14	0,23	0,14	0,54	0,14	0,23
Viszerales Fett (10^3 cm^3)	0,05	0,25	0,08	0,11	0,08	0,16	0,07	0,32	0,1	0,13
OGIS ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	-0,0005	0,46	-0,0005	0,43	-0,0004	0,54	-0,0001	0,91	-0,0005	0,53
In ISlcomp	-0,06	0,32	-0,06	0,3	-0,06	0,33	-0,04	0,53	-0,07	0,31
QUICKI	-0,05	0,96	-0,11	0,91	-0,12	0,9	0,13	0,9	-0,11	0,92

Tab. 3-5 Unabhängige Prädiktoren des γ -ATP/Pi

Angegeben sind der Regressionskoeffizient β und der zugehörige p-Wert. Modell 1: einfaches Modell, Modell 2: Adjustiert für Geschlecht, Modell 3: adjustiert für Geschlecht und Alter, Modell 4a: adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI, Modell 4b: adjustiert für Geschlecht, Alter und Leberfettgehalt, In: Logarithmus naturalis, OGIS: oral glucose insulin sensitivity, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

3.6 Basischarakteristika abhängig von der hepatischen Steatose

Um zu prüfen, ob das Vorliegen einer hepatischen Steatose sich auf die Insulinresistenz oder den Leber-ATP-Gehalt auswirkt, wurde die Studienkohorte abhängig vom HSI in 3 Gruppen eingeteilt (**Tab.3-6**). Die Gruppe HSI 1 wurde durch 21 Probanden mit einem HSI <30 gebildet. Bei diesen Probanden lag somit zum Untersuchungszeitpunkt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine hepati-

3 Ergebnisse

sche Steatose vor. Die Gruppe HSI 3 wurde durch 20 Probanden mit einem HSI >36 gebildet, sodass bei diesen Probanden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine hepatische Steatose vorlag. Die Gruppe HSI 2 beinhaltete alle Probanden mit einem HSI zwischen 30 bis 36, bei dieser Gruppe konnte eine Steatose nicht sicher ausgeschlossen werden.

Basischarakteristika	Median und IQR	Median und IQR	Median und IQR
	HSI 1	HSI 2	HSI 3
n (männlich/weiblich)	21 [6;15]	34 [14;20]	20 [6;14]
Alter (Jahren)	50 [41; 60]	60 [52; 67]	64,5 [52; 68,5]
BMI (kg/m ²)	21,8 [20,6; 22,7]	25,2 [24; 27]	28,95 [27,65; 30,7]
Taille (cm)	74,8 [71; 81,8]	87,2 [80,6; 94,5]	97,5 [87,75; 101,6]
Gesamtcholesterin (mg/dl)	223 [203; 253]	225 [211; 241]	226 [204; 249]
HDL (mg/dl)	70 [63,5; 86]	65 [59; 77]	56 [50; 78]
LDL (mg/dl)	137 [124; 170]	145,5 [121; 169]	153 [131; 165]
GOT/AST (U/l)	26 [23; 33]	23 [21; 26]	23 [20; 33]
GPT/ALT (U/l)	17 [13; 19]	18 [15; 24]	26 [16,5; 38]
γ-GT (U/l)	17 [12; 27]	23,5 [14; 31]	26,5 [19,5; 35,5]
Triglyzeride (mg/dl)	81 [60; 91]	92 [72; 132]	137 [83; 185]
FFA (μmol/l)	442 [318; 608]	499 [404; 630]	520 [417; 636]
Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	15,6 [13,65; 17,37]	19,30 [16,93; 24,14]	27,4 [22,59; 31,76]
Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	1,25 [0,84; 2,35]	3,23 [2,38; 4,65]	4,35 [3,25; 6,29]
Hepatoz. Fettgehalt (%)	0,68 [0,21; 1,47]	2,84 [0,73; 4,53]	3,19 [0,94; 17,47]
HbA _{1c} (%)	5,4 [5,3; 5,6]	5,45 [5,3; 5,8]	5,6 [5,3; 5,95]
Nüchtern glukose (mg/dl)	72 [66; 75]	75 [70; 81]	80 [72; 85]
2h Glukose (mg/dl)	80 [70; 92]	94 [80; 102]	102 [79; 124]
Nüchterninsulin (mU/l)	5,4 [4,6; 7,7]	5,95 [4,0; 8,4]	7,9 [6,05; 12,75]
2h Insulin (mU/l)	26,9 [17,7; 41,4]	38,75 [28,7; 56,7]	73,4 [41,3; 95,3]
NGT/IFG/IGT/IFG+IGT	20/1/0/0	28/2/3/1	14/1/4/1
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	493 [465; 535]	450 [406; 493]	378 [356; 436]
Hepatische Extraktion (%)	71,2 [64,1; 72,7]	67,5 [63,4; 73,5]	61,65 [53,15; 71,25]
ISIcomp	7,6 [6,04; 11,27]	6,7 [4,87; 9,02]	3,69 [2,93; 6,15]
QUICKI	0,47 [0,44; 0,49]	0,46 [0,42; 0,5]	0,43 [0,41; 0,46]
Adaptations Index (au)	0,44 [0,38; 0,47]	0,41 [0,34; 0,52]	0,51 [0,45; 0,62]
γ-ATP (mmol/l)	2,50 [2,36; 2,61]	2,55 [2,42; 3,28]	2,96 [2,64; 3,24]
Pi (mmol/l)	1,79 [1,48; 2,1]	2,13 [1,6; 2,45]	2,09 [1,67; 2,3]
γ-ATP/Pi (mmol/l)	1,27 [1,18; 1,61]	1,44 [1,22; 1,60]	1,57 [1,27; 1,76]
Adiponektin total (ng/ml)	6881 [5423;10040]	6275 [4958; 10197]	5676 [4361; 9055]
Adiponektin HMW (ng/ml)	3128 [2387; 5195]	3361 [2243; 5995]	2827 [1678; 4662]
IL-6 (pg/ml)	0,44 [0,3; 0,94]	1,03 [0,81; 1,51]	1,38 [1,0; 1,8]
IL-18 (pg/ml)	196 [168; 252]	247 [187; 304]	208 [136; 254]

Tab. 3-6 Basischarakteristika abhängig vom HSI

Angegeben sind Median und 25./75. Perzentile. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, γ-GT: Gamma-Glutamyl-Transferase, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, HDL: High-Density-Lipoprotein, HMW: high molecular weight, HSI: Hepatic Steatosis Index, LDL: Low-Density Lipoprotein, n: Anzahl HSI 1: HSI <30, HSI 2: HSI 30 bis 36, HSI 3: HSI >36

3 Ergebnisse

Im Vergleich der Basischarakteristika der 3 Subgruppen (**Tab. 3-6**) war erwartungsgemäß ein signifikanter Unterschied zwischen der HSI 1 und der HSI 3 Gruppe zu finden (**Tab. 3-7**). So waren die Probanden mit einer hepatischen Steatose durchschnittlich älter, hatten einen höheren BMI und eine schlechtere Insulinsensitivität als die Probanden mit einem HSI <30. Auch bezüglich des Leber-ATP-Gehalts bestand ein deutlicher Unterschied zwischen der HSI 1 und der HSI 3 Gruppe. So ergab sich in der HSI 3 Gruppe ein signifikant höherer ATP-Gehalt, als in der HSI 1 Gruppe. Laborchemisch zeigte sich die ALT in der Gruppe HSI 3 signifikant höher als in den Gruppen HSI 1 und 2. Insgesamt ergab sich in der Gruppe HSI 3 im Vergleich der drei Gruppen das Bild der Risikofaktoren bzw. Charakteristika für eine NAFLD (Übergewicht, erhöhter hepatozellulärer Fettgehalt, Insulinresistenz und laborchemisch Erhöhung der Leberenzyme).

3 Ergebnisse

Basischarakteristika	HSI 1 vs. 2	HSI 1 vs 3	HSI 2 vs. 3
Alter (Jahren)	0,003*	0,007[#]	0,95
BMI (kg/m ²)	<0,0001*	<0,0001[#]	<0,0001⁺
Taille (cm)	0,004*	<0,0001[#]	0,0001⁺
Gesamtcholesterin (mg/dl)	0,77	0,74	0,52
HDL (mg/dl)	0,15	0,003[#]	0,05
LDL (mg/dl)	0,67	0,6	0,87
GOT/AST (U/l)	0,02*	0,26	0,31
GPT/ALT (U/l)	0,74	0,005[#]	0,006⁺
γ-GT (U/l)	0,21	0,18	0,78
Triglyzeride (mg/dl)	0,14	0,007[#]	0,1
FFA (μmol/l)	0,44	0,17	0,43
Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	0,006*	<0,0001[#]	0,0001⁺
Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	<0,0001*	<0,0001[#]	0,11
Hepatoz. Fettgehalt (%)	0,006*	<0,0001[#]	0,29
HbA _{1c} (%)	0,71	0,29	0,42
Nüchtern glukose (mg/dl)	0,07	0,03[#]	0,53
2h Glukose (mg/dl)	0,004*	0,0008[#]	0,33
Nüchterninsulin (mU/l)	0,79	0,006[#]	0,005⁺
2h Insulin (mU/l)	0,24	0,01[#]	0,1
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	0,003*	<0,0001[#]	0,002⁺
Hepatische Extraktion (%)	0,57	0,003[#]	0,06
ISIcomp	0,11	<0,0001[#]	0,001⁺
QUICKI	0,54	0,003[#]	0,007⁺
Adaptations Index (au)	0,99	0,006[#]	0,002⁺
γ-ATP (mmol/l)	0,02*	0,006[#]	0,49
Pi (mmol/l)	0,09	0,21	0,76
γ-ATP /Pi (mmol/l)	0,69	0,17	0,25
Adiponektin total (ng/ml)	0,66	0,14	0,23
Adiponektin HMW (ng/ml)	0,92	0,18	0,11
IL-6 (pg/ml)	0,003*	0,0005[#]	0,33
IL-18 (pg/ml)	0,19	0,51	0,04⁺

Tab. 3-7 Vergleich der Subpopulationen abhängig vom HSI

Angegeben sind die p-Werte für den Vergleich zwischen den Gruppen HSI 1-3. Analysiert wurde mit einem ANOVA-Test mit Fischer-LSD-Adjustierung des p-Wertes. Nicht-normalverteilte Werte wurden logarithmiert. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, γ-GT: Gamma-Glutamyl-Transferase, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, HDL: High-Density-Lipoprotein, HMW: high molecular weight, HSI: Hepatic Steatosis Index, LDL: Low-Density Lipoprotein, n: Anzahl

Ein p-Wert <0,05 wurde entsprechend gekennzeichnet: p<0,05* HSI 1 vs. HSI 2, p<0,05[#] HSI 1 vs. HSI 3, p <0,05⁺ HSI 1 vs. HSI 2

3.7 Basischarakteristika abhängig von der Insulinsensitivität

Zur näheren Betrachtung der Insulinsensitivität erfolgte die Teilung der Studienpopulation in zwei Gruppen (**Tab. 3-8**). Die Zuteilung in die insulinresistente (InsRes Gruppe 1) oder die insulinsensitive (InsSens Gruppe 2) erfolgte anhand des OGIS. Als Cut-off wurde 450 gemäß dem Mittelwert einer gesunden, nicht-diabetischen Population gewählt. Dabei ergaben sich zwei annähernd gleich große Gruppen mit $n=37$ für die Gruppe 1 und $n=39$ für die Gruppe 2.

Die Gruppe 1 war im Vergleich zur Gruppe 2 erwartungsgemäß adipöser mit einem medianen BMI von $27,2 \text{ kg/m}^2$ in der Gruppe 1 und einem medianen BMI von $23,7 \text{ kg/m}^2$ in der Gruppe 2. Entsprechend ergab sich für die Gruppe 1 ein im Vergleich relevant höherer Anteil an subkutanem Fettgewebe ($p 0,02$), viszeralem Fettgehalt ($p<0,001$) und hepatozellulärem Fettgehalt ($p <0,001$). Des Weiteren ergab sich für die ermittelten Indizes zur Bestimmung der Insulinsensitivität eine signifikant schlechtere Insulinsensitivität für die Gruppe 1. Ähnlich verhielt es sich mit den ermittelten Werten des Glukosestoffwechsels aus dem oGTT. So lag der 2 Stunden Blutglukosewert in der Gruppe 1 bei 100 mg/dl im Vergleich zu Gruppe 2 mit 80 mg/dl ($p<0,001$). Auch der Adiponektingehalt (total und HMW) lag in der Gruppe 2 deutlich höher als in der Gruppe 1 ($p<0,001$ für beide Variablen).

Ein relevanter Unterschied der beiden Gruppen in Bezug auf den Leber-ATP-Gehalt konnte nicht festgestellt werden.

3 Ergebnisse

Basischarakteristika	Median und IQR		p-Wert
	Gruppe 1 (InsRes OGIS <450)	Gruppe 2 (InsSens OGIS >450)	
n (männlich/weiblich)	37 [17;20]	39 [10;29]	
Alter (Jahren)	62 [59; 68]	56 [50; 61]	0,02*
BMI (kg/m ²)	27,2 [25,2; 28,5]	23,7 [21,6; 25,4]	<0,001*
Taille (cm)	94,5 [86,3; 100]	81,5 [73,2; 87,8]	<0,001*
Gesamtcholesterin (mg/dl)	222 [213; 251]	226 [199; 246]	0,98
HDL (mg/dl)	47 [49,5; 67]	72 [64; 85]	<0,001*
LDL (mg/dl)	154 [131; 169]	145 [120; 163]	0,22
GOT/AST (U/l)	23 [19,5; 28]	24 [21; 31]	0,39
GPT/ALT (U/l)	22,5 [16,5; 28]	18 [15; 22]	0,04*
γ-GT (U/l)	28 [18; 33,5]	17 [12; 26]	0,35
Triglyzeride (mg/dl)	134 [92; 168]	75 [57; 91]	<0,001*
FFA (μmol/l)	507 [413; 623]	468 [390; 652]	0,75
Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	21,03 [17,34; 27,54]	17,79 [15,34; 21,67]	0,02*
Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	4,33 [3,21; 5,93]	1,9 [1,08; 3,27]	<0,001*
Hepatoz. Fettgehalt (%)	3,77 [1,57; 8,31]	0,71 [0,32; 2,5]	<0,001*
HbA _{1c} (%)	5,6 [5,4; 5,9]	5,4 [5,3; 5,7]	0,15
Nüchtern glukose (mg/dl)	79 [73; 86]	72 [66; 76]	0,001*
2h Glukose (mg/dl)	100 [92; 117]	80 [70; 93]	<0,001*
Nüchterninsulin (mU/l)	7,5 [6,0; 11,2]	5,3 [4,0; 7,1]	0,002*
2h Insulin (mU/l)	63,4 [39,4; 84,5]	27,4 [16,9; 38,9]	<0,001*
NGT/IFG/IGT/IFG+IGT	27/2/6/2	36/2/1/0	
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	398 [359; 428]	499 [465; 537]	<0,001*
Hepatische Extraktion (%)	63,4 [39,4; 84,5]	71,9 [64,6; 76,2]	0,002*
ISIcomp	4,84 [3,12; 6,13]	8,4 [6,72; 11,39]	<0,001*
QUICKI	0,43 [0,41; 0,46]	0,47 [0,44; 0,50]	<0,001*
Adaptations Index (au)	0,48 [0,39; 0,61]	0,42 [0,37; 0,46]	0,01*
γ-ATP (mmol/l)	2,70 [2,50; 3,10]	2,57 [2,36; 3,07]	0,69
Pi (mmol/l)	1,98 [1,64; 2,21]	2,0 [1,56; 2,42]	0,87
IL-6 (pg/ml)	1,27 [0,86; 1,75]	0,82 [0,34; 1,41]	0,04*
Adiponektin total (ng/ml)	5547 [4655; 6329]	8441 [5993; 12119]	<0,001*
Adiponektin HMW (ng/ml)	2558 [1989; 3388]	4784 [2945; 8158]	<0,001*
IL-18 (pg/ml)	220 [187; 285]	202 [168; 275]	0,96

Tab. 3-8 Basischarakteristika abhängig von der Insulinsensitivität

Angegeben sind Median und 25./75. Perzentile, analysiert wurde mittels Student's t-Test und für nicht-normal-verteilte Variablen mittels Wilcoxon-signed rank Test. Ein p-Wert <0,05 ist mit * gekennzeichnet. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, γ-GT: Gamma-Glutamyl-Transferase, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, HDL: High-Density-Lipoprotein, HMW: high molecular weight, LDL: Low-Density Lipoprotein, n: Anzahl

3.8 Unabhängige Prädiktoren des Leber-ATP-Gehaltes bezogen auf die Insulinsensitivität

Zur Prüfung, ob sich der Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Leber und den erhobenen Parametern abhängig von der Insulinsensitivität verändert, wurde eine Regressionsanalyse mit der Gruppe 1 (**Tab. 3-9**) und 2 (**Tab. 3-10**) durchgeführt. In der Analyse erfolgte die Berechnung gemäß des Modells 3 mit einer Adjustierung für Alter und Geschlecht und des Modells 4b mit der zusätzlichen Adjustierung für den Leberfettgehalt.

In der Regressionsanalyse der Gruppe 1 (InsRes) ergab sich eine Korrelation zwischen dem γ -ATP/Pi und dem Adiponektin (total und HMW) im Modell 3 und 4b. In der Regressionsanalyse der Gruppe 2 (InsSens) ergab sich keine weitere Korrelation. In dieser Studienpopulation ergab sich somit auch unter Berücksichtigung der Insulinsensitivität keine Änderung eines Zusammenhangs im Vergleich zur Betrachtung der Gesamtstudienpopulation.

3 Ergebnisse

Variabel	γ-ATP Modell 3		γ-ATP Modell 4b		Pi Modell 3		Pi Modell 4b		γATP/Pi Modell 3		γATP/Pi Modell 4b	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Subkutanes Fett (10 ³ cm ³)	0,0008	1	-0,009	0,98	-0,002	1	-0,008	0,98	-0,66	0,66	0,1	0,67
Viszerales Fett (10 ³ cm ³)	0,001	0,99	-0,08	0,64	-0,12	0,48	-0,2	0,25	0,05	0,68	0,07	0,61
In Glukose 0	-0,19	0,71	-0,31	0,55	-0,27	0,6	-0,35	0,5	0,04	0,92	0,05	0,9
In Insulin 0	-0,09	0,49	-0,15	0,28	-0,15	0,26	-0,2	0,16	0,06	0,55	0,07	0,51
Adaptationsindex (au)	1,08	0,11	1,03	0,13	-0,15	0,83	-0,19	0,79	0,64	0,2	0,65	0,2
Insulinogenic Index early Insulin (au)	-0,02	0,83	-0,03	0,72	-0,02	0,82	-0,03	0,75	-0,01	0,99	0,001	0,99
Insulinogenic Index early C-Peptid (au)	0,0003	1	-0,01	0,92	0,04	0,72	0,03	0,77	-0,03	0,67	-0,04	0,69
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	0,002	0,32	0,003	0,15	0,003	0,17	0,004	0,08	-0,001	0,53	-0,001	0,48
In Hep Extraktion (%)	0,12	0,67	0,19	0,51	0,22	0,44	0,27	0,35	-0,1	0,64	-0,11	0,61
In ISicomp	0,007	0,96	0,57	0,67	0,14	0,27	0,19	0,16	-0,1	0,28	-0,12	0,23
QUICKI	2,37	0,34	3,69	0,16	3,63	0,15	4,81	0,07	-1,32	0,47	-1,61	0,42
In IL-6 (pg/ml)	0,12	0,27	0,09	0,4	-0,06	0,58	-0,09	0,44	0,11	0,15	0,13	0,13
IL-18 (pg/ml)	0,04	0,78	-0,04	0,83	0,009	0,95	-0,05	0,77	0,02	0,83	0,04	0,75
In Adiponektin total (ng/ml)	-0,26	0,23	-0,21	0,35	0,35	0,11	0,43	0,06	-0,33	0,03*	-0,37	0,02*
In Adiponektin HMW	-0,24	0,13	-0,21	0,19	0,23	0,14	0,27	0,09	-0,28	0,01*	-0,3	0,01*

Tab. 3-9 Unabhängige Prädiktoren des γ-ATP, Pi und γ-ATP/Pi abhängig von der Insulinsensitivität (Gruppe 1, OGIS <450, insulinresistent)

Angegeben sind der Regressionskoeffizient β und der zugehörige p-Wert. Modell 3: adjustiert für Geschlecht und Alter, Modell 4b: adjustiert für Geschlecht, Alter und Leberfettgehalt; HIMW: high molecular weight, IL: Interleukin, ln: Logarithmus naturalis, OGIS: oral glucose insulin sensitivity, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

3 Ergebnisse

Variabel	γ-ATP		γ-ATP		Pi		Pi		γATP/Pi		γATP/Pi	
	Modell 3		Modell 4b		Modell 3		Modell 4b		Modell 3		Modell 4b	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Subkutanes Fett (10^3 cm^3)	0,32	0,15	0,28	0,21	0,02	0,94	-0,02	0,9	-0,14	0,38	-0,14	0,37
Viszerales Fett (10^3 cm^3)	0,08	0,5	0,05	0,68	-0,05	0,61	-0,08	0,43	-0,09	0,29	-0,09	0,27
In Glukose 0	-0,1	0,87	-0,04	0,95	-0,36	0,49	-0,31	0,55	-0,2	0,63	-0,2	0,64
In Insulin 0	-0,15	0,37	-0,15	0,35	0,02	0,91	0,01	0,93	0,1	0,4	0,1	0,41
Adaptationsindex (au)	-0,08	0,94	-0,17	0,86	-0,41	0,64	-0,48	0,58	-0,21	0,77	-0,22	0,76
Insulinogenic Index early Insulin (au)	0,03	0,78	0,002	0,98	0,16	0,05	0,14	0,08	0,11	0,08	0,11	0,09
Insulinogenic Index early C-Peptid (au)	-0,006	0,95	-0,02	0,8	0,12	0,11	0,11	0,15	0,11	0,09	0,11	0,1
OGIS ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)	0,00006	0,98	-0,0001	0,96	-0,001	0,63	-0,001	0,58	-0,001	0,61	-0,001	0,61
In Hep Extraktion (%)	-0,42	0,53	-0,2	0,77	-0,66	0,25	-0,51	0,39	-0,18	0,7	-0,17	0,73
In ISComp	0,02	0,91	0,04	0,82	-0,03	0,84	-0,01	0,93	-0,03	0,81	-0,03	0,82
QUICKI	2,12	0,31	2,1	0,31	0,16	0,93	0,15	0,93	-1,1	0,47	-1,1	0,47
In IL-6 (pg/ml)	0,06	0,45	0,07	0,37	-0,04	0,49	-0,04	0,55	-0,06	0,24	-0,06	0,25
IL-18 (pg/ml)	-0,23	0,25	-0,23	0,08	-0,06	0,59	-0,06	0,61	0,06	0,54	0,06	0,54
In Adiponektin total (ng/ml)	-0,13	0,47	-0,08	0,67	-0,02	0,9	0,03	0,87	0,05	0,67	0,06	0,64
In Adiponektin HMW	-0,07	0,55	-0,05	0,7	-0,05	0,6	-0,03	0,75	-0,003	0,97	-0,001	0,99

Tab. 3-10 Unabhängige Prädiktoren des des γ -ATP, Pi und γ -ATP/Pi abhängig von der Insulinsensitivität (Gruppe 2, OGIS >450, insulinsensitiv)

Angegeben sind der Regressionskoeffizient β und der zugehörige p-Wert. Modell 3: adjustiert für Geschlecht und Alter, Modell 4b: adjustiert für Geschlecht, Alter und Leberfettgehalt; HMW: high molecular weight, IL: Interleukin, In: Logarithmus naturalis, OGIS: oral glucose insulin sensitivity, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigte, dass in einer nicht-adipösen, nicht-diabetischen Population der Zusammenhang zwischen der Energiebalance der Leberzellen, gemessen am γ -ATP-Gehalt und der Insulinsensitivität bzw. dem subkutanen Fettgehalt vollständig abhängig von Geschlecht und dem Gesamtkörperfettgehalt ist. Die Klassifizierung nach Subgruppen bezogen auf das Vorliegen einer hepatischen Steatose ergab höhere ATP-Konzentrationen der Leber bei hepatischer Steatose. Dieser Zusammenhang war jedoch nach Adjustierung auf Alter und Geschlecht nicht mehr nachweisbar.

4.1 BMI und Leber-ATP-Gehalt

Zur Korrelation zwischen dem BMI und dem Leber-ATP-Gehalt bzw. der Mitochondrienfunktion der Leber finden sich in der Literatur unterschiedliche Daten. Nair et al.⁸¹ beobachteten eine inverse Korrelation zwischen dem BMI und dem Leber-ATP-Gehalt gemessen mittels ^{31}P MRS (Korrelationskoeffizient = -0,63; $p=0,02$). Informationen zur Insulinsensitivität, einem Diabetes in der Familiengeschichte oder einer NAFLD lagen allerdings nicht vor. Das Altersfenster der Studie war mit 18-60 Jahren sehr breit und die Gruppe bestand vorwiegend aus Frauen (80%). Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich davon durch einen Frauenanteil von etwa 60% und ein deutlich schmaleres Altersspektrum. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Ratten, deren Leber-ATP-Gehalt bei Steatose signifikant reduziert war⁷⁹. Auch in dieser Studie wurde kein Bezug zur Insulinsensitivität hergestellt bzw. diese berücksichtigt.

Andererseits konnte bei übergewichtigen, glukoseintoleranten und insulinresistenten 6C1-Mäusen eine größere oxidative Kapazität als bei normalgewichtigen, glukosetoleranten und insulinsensitiven 6C2-Mäusen festgestellt werden, obwohl der Gehalt an Mitochondrien pro Gramm der Leber in den 6C1-Mäusen geringer war als in den 6C2-Mäusen¹⁰⁰. Allerdings war das Lebervolumen der 6C1-Mäuse größer, sodass die Gesamtmenge an Mitochondrien vergleichbar war. Analog konnte auch im Menschen mittels Leberbiopsien und euglyk-

4 Diskussion

misch-hyperinsulinämischen Clamp gezeigt werden, dass eine Kompensation durch die Steigerung der mitochondrialen Respiration gemessen in Leberbiopsaten von übergewichtigen Probanden mit und ohne NAFLD nachweisbar ist, welche erst beim Vorliegen einer NASH verloren geht ⁷⁸. Ähnliche Ergebnisse waren auch mittels in vivo Analyse unter Verwendung von ²H und ¹³C-Tracern zur Bestimmung der hepatischen Lipolyse, der Glukoneogenese und den mitochondrialen Abbauwegen zu finden ⁷⁴. Der mitochondriale, oxidative Metabolismus in Probanden mit NAFLD war doppelt so hoch, als der von Probanden ohne NAFLD und positiv mit dem intrahepatischen Triglyzeridgehalt korreliert. Die Probanden wiesen eine um 50% gesteigerte Lipolyse und eine um 30% gesteigerte Glukoneogenese auf, so dass es sich auch hier um einen Kompensationsmechanismus handeln könnte. Fritsch et al. zeigten in ihrer Arbeit ähnliche Ergebnisse, indem sie bei Probanden mittels ¹H/³¹P-MRS den postprandialen ATP-Gehalt der Leber ermittelten. Dabei wurden junge, gesunde Probanden, übergewichtige Probanden und Probanden mit einem Typ-2 Diabetes miteinander verglichen und die Gruppe der übergewichtigen Probanden zeigte einen 6-fach höheren Anstieg des ATP-Gehaltes der Leber ¹⁰¹.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse früherer Arbeiten nicht einheitlich sind, was mitunter an den unterschiedlichen Methoden und der unterschiedlichen Betrachtung der insgesamt meist sehr kleinen Kohorten liegen könnte. Die Assoziation von Leber-ATP-Gehalt zum BMI ist konsistent mit anderen Arbeiten, dass diese allerdings nur schwach ist und nach Adjustierung auf das Geschlecht bereits nicht mehr nachweisbar ist, kann Folge eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes im Körperfettgehalt sowie der Körperfettverteilung sein. Durch die in anderen Arbeiteten beobachtete Kompensation des mitochondrialen Stoffwechsels bei NAFLD ist bei dem hier untersuchten Kollektiv, das einen normalen Leberfettgehalt aufwies, der mitochondriale Stoffwechsel im Gleichgewicht, so dass keine Unterschiede in der Gesamtpopulation erkennbar waren. Nach Einteilung der Gesamtpopulation in Subgruppen abhängig vom Grad der Steatose nach HSI konnte ein signifikant höherer Leber-ATP Gehalt in der Gruppe mit dem höchsten Leberfettanteil nachgewie-

sen werden, was zu den Ergebnissen der übrigen Arbeiten passt und eine gewisse, gewebespezifische Anpassungsfähigkeit auf ein erhöhtes Nahrungsangebot bzw. Substratangebot bei Übergewicht vermuten lässt.

4.2 Insulinresistenz und Leber-ATP-Gehalt

In der vorliegenden Arbeit galt es zu prüfen, ob eine Einschränkung des Mitochondrienstoffwechsels bereits mit einer Insulinresistenz ohne manifesten Typ-2 Diabetes assoziiert ist. Bei Patienten mit Typ-2 Diabetes bestand ein inverser Zusammenhang zwischen der hepatischen Insulinresistenz und dem γ -ATP- und Pi-Gehalt der Leber, Patienten mit Typ-2 Diabetes wiesen einen um 26% geringeren γ -ATP-Gehalt als Alters- und BMI-angepasste Kontrollen (mCON), und einen um 23% geringeren γ -ATP-Gehalt als junge und gesunde Kontrollen (yCON) auch nach Adjustierung für den hepatozellulären Lipidgehalt auf ¹⁰². Die Ratio Pi/ γ -ATP war allerdings in allen Gruppen vergleichbar. Ob der 23%ige Unterschied im γ -ATP-Gehalt zwischen den Alters- und BMI-angepassten Kontrollen und den schlanken und jungen Kontrollen Ausdruck einer kompensatorisch gesteigerten Mitochondrienfunktion war, bleibt allerdings aufgrund der geringen Probandenzahl offen. Analog war auch der hepatische ATP-turnover bei Patienten mit Typ-2 Diabetes um 42% und die hepatische Insulinsensitivität um 28% geringer als in gesunden Kontrollen ⁷⁷. Nach Adjustierung für den BMI und den hepatozellulären Lipidgehalt bestand weiter eine positive Assoziation zwischen der hepatischen Insulinsensitivität und dem hepatischem ATP-Turnover, jedoch zusätzlich eine inverse Korrelation zu dem BMI und der Nüchternblutglukose. Im Gegensatz dazu war bei stoffwechselgesunden, übergewichtigen Probanden eine Steigerung des hepatischen ATP-Gehaltes zu beobachten ^{74, 78}, die anscheinend einen noch intakten Kompensationsmechanismus darstellt, der erst bei manifestem Typ-2 Diabetes oder NASH verloren geht. Da in der vorliegenden Arbeit ein gesundes Probandenkollektiv ohne Einschränkung des Kohlenhydratstoffwechsels und mit normalem Leberfettgehalt untersucht wurde, ist es erklärbar, dass nach Adjustierung auf Geschlechts- Alters- und BMI-Unterschiede keine Assoziation mit Indizes der Insulinresistenz

(QUICKI, ISIcomp und OGIS) mehr beobachtet werden konnte.

4.3 NASH und Leber-ATP-Gehalt

In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Dekompensation des mitochondrialen Metabolismus assoziiert ist mit inflammatorischen Prozessen vor allem im Sinne einer NASH^{78, 103, 104}. Bei Vorhandensein einer NASH schien die mitochondriale Kompensation verloren zu gehen und es lag häufiger eine Insulinresistenz vor als bei Probanden mit NAFLD und ähnlich hohem BMI⁷⁸. Bei Vorliegen einer NASH besteht ein deutlicher Zusammenhang mit einer gestörten Funktion der hepatischen Mitochondrien gemessen mittels ¹³C-Methionin-Atmungstest. Die gestörte Mitochondrienfunktion wird durch strukturelle mitochondriale Defekte bei einer NASH bedingt, während eine periphere Insulinresistenz (ermittelt durch euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp) die β -Oxidation in den Hepatozyten fördert¹⁰⁴. Zusammenfassend lässt sich aus den o.g. Arbeiten schließen, dass eine Assoziation zwischen einer NASH und einer mitochondrialen Funktionsstörung besteht. Ob der hohe Anteil an Triglyzeriden und der gesteigerte Fettsäureabbau, die zu einer Aktivierung inflammatorischer Substanzen von Zytokinen wie IL-6 und TNF α führen⁷⁶, zu einer weiteren Zellschädigung der Hepatozyten und der Mitochondrien selbst führen und damit die NASH durch eine Steigerung des oxidativen Stresses manifestieren, bleibt unklar. In der vorliegenden Arbeit war bei einem gesunden Probandenkollektiv zwar initial ein Zusammenhang zwischen IL-6 und dem γ -ATP der Leber zu beobachten, dieser war nach Adjustierung in den verschiedenen Regressionsmodellen nicht mehr nachweisbar und scheint eher Ausdruck von unterschiedlich hohen IL-6 Spiegeln bei Männern und Frauen und der Kopplung an die Körperfettverteilung und den Körperfettgehalt zu sein.

4.4 Limitationen der Studie

Diese Studie ist eine Querschnittsstudie, wodurch eine Aussage über Kausalzusammenhänge nicht möglich ist, es können lediglich Assoziationen beschrieben werden. Kausalzusammenhänge können nur durch Längsschnittuntersu-

chungen betrachtet werden. Allerdings übersteigt das Ausmaß der metabolischen Phänotypisierung bei dieser Untersuchung mittels oGTT und ^{31}P -MRS sowie ^1H -MRS zur Bestimmung der Körperfettverteilung in den verschiedenen Depots bei 76 Probanden die in bisherigen Studien erhobenen Daten deutlich. Eine Einschränkung ist die Homogenität des Kollektivs, das mit Probanden mit einem mittleren Alter von 57 Jahren und einem BMI im leicht übergewichtigen Bereich zwar gut die deutsche Bevölkerung repräsentiert ⁹⁷, Analysen zum Zusammenhang von Alter bzw. BMI und Leber-ATP-Gehalt allerdings erschwert. Zudem liegt der Leberfettgehalt im Mittel deutlich im normalen Bereich, nur knapp 20% aller Probanden wiesen einen erhöhten hepatozellulären Fettgehalt auf.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer nicht-diabetischen Population und konnte an einer vergleichsweise großen Kohorte zeigen, dass keine Assoziation zwischen einem verringerten ATP-Gehalt der Leber und einer Insulinresistenz in einer nicht-diabetischen Population *in vivo* besteht. Um jedoch eine Kausalität zwischen einer mitochondrialen Funktionsstörung in der Leber und einer Insulinresistenz gänzlich zu klären und mögliche Einflussfaktoren genau zu bestimmen, bedarf es Längsschnittstudien.

Dass die mitochondriale Funktionsstörung in der Leber einer multifaktoriellen Genese unterliegt, konnte anhand der bereits veröffentlichten Arbeiten und der Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt werden. Welches jedoch der am meisten bestimmende Einflussfaktor ist (Insulinresistenz, NAFLD, Übergewicht, etc.), bleibt aktuell offen, sodass gerade darauf in weiteren Arbeiten eingegangen werden muss. Es wäre bei der erneuten Durchführung einer Querschnittstudie beispielsweise überlegenswert das Studiendesign von Koliaki et al. auf eine diabetische Kohorte anzuwenden und diese miteinander zu vergleichen.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Hepatozytenstoffwechsels bei Insulinresistenz.....	12
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der hepatischen Mitochondrienfunktion bei nicht-alkoholischer Steatose.....	16
Abb. 3.1 Zusammensetzung des Studienkollektivs	42

5.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Referenzwerte des oGTT bei venöser Glukosemessung ¹	4
Tab. 1-2 Assoziation zwischen Leber-ATP-Gehalt, NAFLD und Insulinresistenz – bereits veröffentlichte Daten	20
Tab. 3-1 Basischarakteristika.....	45
Tab. 3-2 Korrelationen mit dem Leber ATP-Gehalt.....	46
Tab. 3-3 Unabhängige Prädiktoren des γ -ATP	47
Tab. 3-4 Unabhängige Prädiktoren des Pi.....	48
Tab. 3-5 Unabhängige Prädiktoren des γ -ATP/Pi	48
Tab. 3-6 Basischarakteristika abhängig vom HSI	49
Tab. 3-7 Vergleich der Subpopulationen abhängig vom HSI	51
Tab. 3-8 Basischarakteristika abhängig von der Insulinsensitivität	53
Tab. 3-9 Unabhängige Prädiktoren des γ -ATP, Pi und γ -ATP/Pi abhängig von der Insulinsensitivität (Gruppe 1, OGIS <450, insulinresistent) ...	55
Tab. 3-10 Unabhängige Prädiktoren des des γ -ATP, Pi und γ -ATP/Pi abhängig von der Insulinsensitivität(Gruppe 2, OGIS >450, insulin sensitiv)	56

6 Literaturverzeichnis

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **27**, 5S–10 (2004).
2. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **365**, 1333–1346 (2005).
3. Heidemann, C., Du, Y., Schubert, I., Rathmann, W. & Scheidt-Nave, C. Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **56**, 668–677 (2013).
4. Shaw, J. E., Sicree, R. A. & Zimmet, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87**, 4–14
5. Narayan, K. M. V., Boyle, J. P., Thompson, T. J., Sorensen, S. W. & Williamson, D. F. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA* **290**, 1884–1890 (2003).
6. Gambert, S. R. & Pinkstaff, S. Emerging Epidemic: Diabetes in Older Adults: Demography, Economic Impact, and Pathophysiology. *Diabetes Spectr.* **19**, 221–228 (2006).
7. Köster, I., Huppertz, E., Hauner, H. & Schubert, I. Direct costs of diabetes mellitus in Germany - CoDiM 2000-2007. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **119**, 377–385 (2011).
8. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* **38 Suppl**, S8–S16 (2015).
9. Ellul, D. A. Glycosylated Hemoglobin: a literature review. *Am. J. Med. Technol.* **46**, 657–661 (1980).
10. Carruthers, A. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol. Rev.* **70**, 1135–1176 (1990).
11. Khera, P. K. *et al.* Evidence for interindividual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes* **57**, 2445–2452 (2008).
12. Virtue, M. A., Furne, J. K., Nuttall, F. Q. & Levitt, M. D. Relationship

between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. *Diabetes Care* **27**, 931–935 (2004).

13. Tabák, A. G. *et al.* Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet Lond. Engl.* **373**, 2215–2221 (2009).
14. Kumashiro, N. *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 16381–16385 (2011).
15. McCarthy, M. I. & Hirschhorn, J. N. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Hum. Mol. Genet.* **17**, R156–165 (2008).
16. Herder, C. & Roden, M. Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**, 679–692 (2011).
17. Talmud, P. J. *et al.* Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *BMJ* **340**, b4838 (2010).
18. Dimas, A. S. *et al.* Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes* **63**, 2158–2171 (2014).
19. Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S. & Kahn, C. R. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* **113**, 909–915 (1990).
20. Rothman, D. L. *et al.* Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 983–987 (1995).
21. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171–176 (2000).
22. Florez, J. C. *et al.* TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N. Engl. J. Med.* **355**, 241–250 (2006).
23. Teichert, T. *et al.* Association between traffic-related air pollution, subcli-

nical inflammation and impaired glucose metabolism: results from the SALIA study. *PLoS One* **8**, e83042 (2013).

24. Kodavanti, U. P. Air pollution and insulin resistance: do all roads lead to Rome? *Diabetes* **64**, 712–714 (2015).

25. Krämer, U. *et al.* Traffic-related air pollution and incident type 2 diabetes: results from the SALIA cohort study. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1273–1279 (2010).

26. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852–871 (2012).

27. DeFronzo, R. A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* **50**, 191–197 (1997).

28. Boden, G. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3–10 (1997).

29. Szendroedi, J. & Roden, M. Ectopic lipids and organ function: *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 50–56 (2009).

30. Szendroedi, J., Phielix, E. & Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 92–103 (2011).

31. Brozinick, J. T., Berkemeier, B. A. & Elmendorf, J. S. ‘Actin’g on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr. Diabetes Rev.* **3**, 111–122 (2007).

32. Shulman, G. I. *et al.* Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* **322**, 223–228 (1990).

33. Perseghin, G. *et al.* Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* **48**, 1600–1606 (1999).

34. Schenk, S. & Horowitz, J. F. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **117**, 1690–1698 (2007).

35. Dubé, J. J. *et al.* Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294**, E882-888 (2008).
36. Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmedder, F. & Boden, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* **51**, 2005–2011 (2002).
37. Szendroedi, J. *et al.* Role of diacylglycerol activation of PKC β in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9597–9602 (2014).
38. Schmitz-Peiffer, C. & Biden, T. J. Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes* **57**, 1774–1783 (2008).
39. Gaster, M., Rustan, A. C. & Beck-Nielsen, H. Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes. *Diabetes* **54**, 648–656 (2005).
40. Chavez, J. A. & Summers, S. A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**, 101–109 (2003).
41. Thompson, A. L., Lim-Fraser, M. Y., Kraegen, E. W. & Cooney, G. J. Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E577-584 (2000).
42. Straczkowski, M. *et al.* Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* **53**, 1215–1221 (2004).
43. Wang, Q. *et al.* Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4008–4018 (1999).
44. Fayard, E., Tintignac, L. A., Baudry, A. & Hemmings, B. A. Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 5675–5678 (2005).
45. Bikman, B. T. & Summers, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* **121**, 4222–4230 (2011).

46. Younossi, Z. M. *et al.* Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **9**, 524–530.e1; quiz e60 (2011).
47. Petersen, K. F. *et al.* Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 603–608 (2005).
48. Fabbrini, E. *et al.* Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15430–15435 (2009).
49. Merkel, M. *et al.* Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J. Clin. Invest.* **102**, 893–901 (1998).
50. Kolb, H. & Mandrup-Poulsen, T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* **53**, 10–20 (2010).
51. Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. & Webb, D. J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1286–1292 (2007).
52. Hotamisligil, G. S. & Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 923–934 (2008).
53. Andreasen, A. S. *et al.* Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1697–1705 (2008).
54. Michael, M. D. *et al.* Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* **6**, 87–97 (2000).
55. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* **7**, 95–96 (2008).
56. Krssak, M. *et al.* Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 3048–3056 (2004).
57. Dentin, R. *et al.* Hepatic glucokinase is required for the synergistic action

- of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 20314–20326 (2004).
58. Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1793–1801 (2006).
59. Roden, M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes-- pathogenesis and clinical relevance. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2**, 335–348 (2006).
60. Serfaty, L. & Lemoine, M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab.* **34**, 634–637 (2008).
61. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD) & European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia* **59**, 1121–1140 (2016).
62. Clark, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* **40 Suppl 1**, S5-10 (2006).
63. Tolman, K. G. & Dalpiaz, A. S. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 1153–1163 (2007).
64. Hsiao, P.-J. *et al.* Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 2118–2123 (2007).
65. Angulo, P. & Lindor, K. D. Non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17 Suppl**, S186-190 (2002).
66. Moscatiello, S., Manini, R. & Marchesini, G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **17**, 63–70 (2007).
67. Wanless, I. R. & Lentz, J. S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatol. Baltim. Md* **12**, 1106–1110 (1990).
68. de Marco, R. *et al.* Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Ve-

rona Diabetes Study. *Diabetes Care* **22**, 756–761 (1999).

69. Marchesini, G. *et al.* Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* **107**, 450–455 (1999).

70. Nijhuis, J. *et al.* Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obes. Silver Spring Md* **17**, 2014–2018 (2009).

71. Sivitz, W. I. & Yorek, M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 537–577 (2010).

72. Krssak, M. *et al.* Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* **42**, 113–116 (1999).

73. Koves, T. R. *et al.* Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7**, 45–56 (2008).

74. Sunny, N. E., Parks, E. J., Browning, J. D. & Burgess, S. C. Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* **14**, 804–810 (2011).

75. Walter, P., Paetkau, V. & Lardy, H. A. Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. 3. The role and regulation of mitochondrial processes involved in supplying precursors of phosphoenolpyruvate. *J. Biol. Chem.* **241**, 2523–2532 (1966).

76. Holland, W. L. *et al.* Lipid-induced insulin resistance mediated by the pro-inflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1858–1870 (2011).

77. Schmid, A. I. *et al.* Liver ATP Synthesis Is Lower and Relates to Insulin Sensitivity in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **34**, 448–453 (2011).

78. Koliaki, C. *et al.* Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic Fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* **21**, 739–746 (2015).

79. Vendemiale, G. *et al.* Mitochondrial oxidative injury and energy metabo-

lism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatol. Baltim. Md* **33**, 808–815 (2001).

80. Mårtensson, J. & Meister, A. Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 471–475 (1989).

81. Nair, S., P Chacko, V., Arnold, C. & Diehl, A. M. Hepatic ATP reserve and efficiency of replenishing: comparison between obese and nonobese normal individuals. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 466–470 (2003).

82. Sharma, R. *et al.* Investigation of hepatic gluconeogenesis pathway in non-diabetic Asian Indians with non-alcoholic fatty liver disease using in vivo ((³¹P) phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Atherosclerosis* **203**, 291–297 (2009).

83. German National Cohort (GNC) Consortium. The German National Cohort: aims, study design and organization. *Eur. J. Epidemiol.* **29**, 371–382 (2014).

84. Krebs, M. *et al.* Prevention of in vitro lipolysis by tetrahydrolipstatin. *Clin. Chem.* **46**, 950–954 (2000).

85. Kim, D. L., Kim, S. D., Kim, S. K., Park, S. & Song, K. H. Is an Oral Glucose Tolerance Test Still Valid for Diagnosing Diabetes Mellitus? *Diabetes Metab. J.* **40**, 118–128 (2016).

86. Nowotny, B. *et al.* Mechanisms underlying the onset of oral lipid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* **62**, 2240–2248 (2013).

87. Aso, Y. *et al.* Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes* **55**, 1954–1960 (2006).

88. Machann, J. *et al.* Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized ¹H-MR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **55**, 913–917 (2006).

89. Laufs, A. *et al.* Quantitative liver ³¹P magnetic resonance spectroscopy at 3T on a clinical scanner. *Magn. Reson. Med.* **71**, 1670–1675 (2014).

90. Ordidge R., Connelly A, Lohman JA. Image-selected in vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective NMR spectroscopy. *J Magn Reson* 283–294 (1986).
91. Zakian, K. L. *et al.* Liver regeneration in humans is characterized by significant changes in cellular phosphorus metabolism: assessment using proton-decoupled ³¹P-magnetic resonance spectroscopic imaging. *Magn. Reson. Med.* **54**, 264–271 (2005).
92. Mari, A., Pacini, G., Murphy, E., Ludvik, B. & Nolan, J. J. A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care* **24**, 539–548 (2001).
93. Katz, A. *et al.* Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2402–2410 (2000).
94. Matsuda, M. & DeFronzo, R. A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**, 1462–1470 (1999).
95. Stadler, M. *et al.* Increased plasma amylin in type 1 diabetic patients after kidney and pancreas transplantation: A sign of impaired beta-cell function? *Diabetes Care* **29**, 1031–1038 (2006).
96. Lee, J.-H. *et al.* Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **42**, 503–508 (2010).
97. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie ‘Gesundheit in Deutschland aktuell 2010’. (Robert-Koch-Inst, 2012).
98. Wu, F., Jeneson, J. A. L. & Beard, D. A. Oxidative ATP synthesis in skeletal muscle is controlled by substrate feedback. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C115-124 (2007).
99. Tura, A., Kautzky-Willer, A. & Pacini, G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **72**, 298–301 (2006).
100. Buchner, D. A. *et al.* Increased mitochondrial oxidative phosphorylation in

the liver is associated with obesity and insulin resistance. *Obes. Silver Spring Md* **19**, 917–924 (2011).

101. Fritsch, M. *et al.* Time course of postprandial hepatic phosphorus metabolites in lean, obese, and type 2 diabetes patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 1051–1058 (2015).

102. Szendroedi, J. *et al.* Abnormal hepatic energy homeostasis in type 2 diabetes. *Hepatol. Baltim. Md* **50**, 1079–1086 (2009).

103. Banasch, M., Ellrichmann, M., Tannapfel, A., Schmidt, W. E. & Goetze, O. The non-invasive (13)C-methionine breath test detects hepatic mitochondrial dysfunction as a marker of disease activity in non-alcoholic steatohepatitis. *Eur. J. Med. Res.* **16**, 258–264 (2011).

104. Sanyal, A. J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**, 1183–1192 (2001).

7 Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
DAG	Diazylglyzerol
FFA	free fatty acids
GNG	Glukoneogenese
GLUT	Glukosetransporter
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
Hb	Hämoglobin
HCL	hepatozellulärer Fettgehalt
HDL	High Density Lipoprotein
HKT	Hämatokrit
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMW	high-molecular-weight
IFG	impaired fasting glucose
IGT	impaired glucose tolerance
IL	Interleukin
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
ISI _{comp}	composite insulin sensitivity index (Matsuda index)
LDL	Low Density Lipoprotein
Ln	Logarithmus naturalis
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MRS	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NAFLD	nicht-alkoholische Steatose
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
OGIS	oral glucose insulin sensitivity

7 Abkürzungsverzeichnis

oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PDE	Phosphordiester
Pi	anorganisches Phosphat
PME	Phosphormonophosphat
PKC	Proteinkinase C
QUICKI	Quantitative insulin sensitivity check index
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
TE	Time of echo
TR	Time of repetition
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VOI	Volume of interest
WHO	World Health Organization

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. univ. Michael Roden für die Bereitstellung des Themas, die Initiierung der Studie und die rezidivierende, konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Bettina Nowotny für ihre große Hilfe, Geduld und ihre Mühen. Vom ersten Studientag bis zur Fertigstellung der Arbeit stand sie stets mit Rat und Tat zur Seite und führte mich sehr gut an das wissenschaftliche Arbeiten heran. Zudem danke ich Frau Dr. med. Sabine Kahl für die große Unterstützung zu Beginn und zum Ende dieser Arbeit – so schließt sich der Kreis.

Herrn Peter Nowotny und Frau Irena Latta danke ich für die Einführung in die Probenverarbeitung und für die laborchemischen Auswertungen.

Valerie Stamm möchte ich von Herzen für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit, des Studiums und des Lebens danken.

Ganz besonders danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Oma, die stets versuchten alles für ihre drei Kinder möglich zu machen und mir die besten Voraussetzungen für das Studium geschaffen haben. Auch meinen Schwestern danke ich für ihre antreibenden Worte und die Unterstützung in jeder Lebenslage.